

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年11 月17 日 (17.11.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/108574 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/11, A61K 45/00, A61P 25/18, 25/22, 25/24, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q 1/02, 1/68, G01N 33/15, 33/50
- (74) 代理人: 榎本 雅之, 外(ENOMOTO, Masayuki et al.); 〒5418550 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号 住友化学知的財産センター株式会社内 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005077
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2005 年3 月15 日 (15.03.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2004-072244 2004 年3 月15 日 (15.03.2004) JP
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友化学株式会社 (SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1048260 東京都中央区新川二丁目2 7 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高橋 康彦 (TAKAHASHI, Yasuhiko) [JP/JP]; 〒5610802 大阪府豊中市曽根東町2-10-3-324 Osaka (JP). 大江田 憲治 (OEDA, Kenji) [JP/JP]; 〒6038147 京都府京都市北区上御霊上江町251-1-202 Kyoto (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: Gm1 PROMOTER AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: Gm1 プロモーター及びその利用

(57) Abstract: A polynucleotide having the base sequence of promoter region of gene coding for trimer G protein α -subunit Gm1. In particular, there is provided the above-mentioned polynucleotide wherein the base sequence of promoter region is, for example, as follows: (1) base sequence of SEQ ID NO: 1, or (2) base sequence defined by base number 603 to 3871 of the base sequence of SEQ ID NO: 1. Further, there is provided use of the polynucleotide.

(57) 要約: 本発明は、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を有するポリヌクレオチド、より具体的には、プロモーター領域の塩基配列が、例えば(1)、(2)等に記載される塩基配列である前記ポリヌクレオチド、及びその利用等に関する。(1)配列番号1で示される塩基配列、(2)配列番号1で示される塩基配列における塩基番号603番から3871番で示される塩基配列



WO 2005/108574 A1

明細書

Gm1 プロモーター及びその利用

技術分野

- 5 本発明は、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子のプロモーター及びその利用に関する。

背景技術

- 10 Gタンパク質は、7回膜貫通型受容体であるGタンパク質共役型受容体（以下、GPCRと記すこともある。；G-protein coupled receptor）が受けた刺激のシグナルを細胞内に運ぶ伝達器としての役割を果たす。Gタンパク質は α β γ のサブユニットからなる。 α サブユニットにGDPが結合した不活性型のGタンパク質では、ホルモンや神経伝達物質などの受容体アゴニストがGPCRに結合すると、 α サブユニットからGDPが放出され、これに代えてGTPが結合する。 α サブユニットにGTPが結合した活性型G
- 15 タンパク質は、GPCRから離れるとともに、GTP結合型 α サブユニットと β γ サブユニットとに解離する。活性型Gタンパク質は、標的エフェクターであるアデニル酸シクラーゼ、 Ca^{2+} チャネル、 K^{+} チャネル、ホスホリパーゼ $\text{C}\beta$ 等を促進又は抑制することにより、多彩な細胞機能を調節する。活性型Gタンパク質の α サブユニットに結合したGTPは、 α サブユニットが有するGTPaseの作用によりGDPとなり、不活性型に戻る。

- 20 これまで、哺乳動物の細胞において多種類のGタンパク質が同定されている。これらのGタンパク質はそれぞれ固有の組織分布を示す。例えば、神経細胞、嗅細胞、視細胞、味細胞、肺細胞、腎細胞又は肝細胞等に分布するGタンパク質が知られている。Gタンパク質は、このような固有の組織において細胞のシグナル伝達系に関与することにより、ホルモン受容、神経伝達、細胞の増殖・分化などに重要な役割を果たす
- 25 。

Gタンパク質 α サブユニットが正常な機能を失うことにより、様々な疾患が誘発されることが明らかになってきている。例えば、Gタンパク質 α サブユニットGsが定常的に活性化されることにより、下垂体腫瘍、甲状腺腫瘍又はMcCune-Albright症候

群等の疾患が誘発される。また、Gタンパク質 α サブユニットGsの機能が消失することにより、偽性副甲状腺機能低下症が誘発される。また、Gタンパク質 α サブユニットGi2が定常的に活性化されることにより、下垂体腫瘍、副腎皮質腫瘍又は子宮腫瘍が誘発される（例えば、G protein mutations in endocrine diseases, European Journal of Endocrinology (2001)vol.145, 545-559）。

発明の開示

本発明は、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能力を有する塩基配列を有するポリヌクレオチドを提供する。当該ポリヌクレオチドは、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1の発現量の異常、又は、当該サブユニットをコードする遺伝子のプロモーターを介したシグナル伝達の異常に起因する疾患の治療・改善・予防のための医薬（即ち、治療薬、改善薬又は予防薬）の有効成分としての化合物を探索するための方法等において利用することができる。

より詳しくは、本発明は、

1. 三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を有することを特徴とするポリヌクレオチド（以下、本発明ポリヌクレオチドと記すこともある。）；

2. プロモーター領域の塩基配列が、以下の（1）～（4）のいずれかに記載される塩基配列であることを特徴とする前項1記載のポリヌクレオチド。

（1）配列番号1で示される塩基配列、

（2）配列番号1で示される塩基配列における塩基番号603番から3871番で示される塩基配列、

（3）上記（1）又は（2）の塩基配列において1個もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつ三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能力を有する塩基配列、及び

（4）上記（1）又は（2）の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下にハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的であり、かつ三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能

力を有する塩基配列；

3. 前項1又は2記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とするプラスミド（以下、本発明プラスミドと記すこともある。）；

4. 前項1又は2記載のポリヌクレオチドを含有し、かつ当該ポリヌクレオチドの下流（3'側）に、当該ポリヌクレオチドによって転写が制御されるポリヌクレオチドを含有することを特徴とするプラスミド；

5. 前項1又は2記載のポリヌクレオチドを含有し、かつ当該ポリヌクレオチドの下流（3'側）に、当該ポリヌクレオチドによって転写が制御されるレポーター遺伝子を含有することを特徴とするプラスミド；

10 6. 前項1又は2記載のポリヌクレオチドが導入されてなる形質転換細胞；

7. 前項3又は4記載のプラスミドが導入されてなる形質転換細胞；

8. 前項5記載のプラスミドが導入されてなる形質転換細胞（以下、前項5及び6に記載の形質転換細胞と一括して、本発明形質転換細胞と記すこともある。）；

15 9. 三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子のプロモーターを介したシグナル伝達調節物質の探索方法であって、

（1）前項8記載の形質転換細胞に被験物質を接触させる第一工程、

（2）前記第一工程後に、レポーター遺伝子の発現量又はそれと相関する指標値をモニターする第二工程、

20 （3）前記第二工程によりモニターされた発現量又はそれと相関する指標値の変化に基づき、前記物質が有する、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子のプロモーターを介してシグナル伝達を調節する能力を評価する第三工程、及び

25 （4）前記第三工程で評価されたシグナル伝達調節能力に基づき、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子のプロモーターを介してシグナル伝達を調節する能力を有する物質を選抜する第四工程、

を有することを特徴とする探索方法（以下、本発明探索方法と記すこともある。）；

10. 物質が有する、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子のプロモーターを介したシグナル伝達調節能力を評価する方法であって、

(1) 前項 8 記載の形質転換細胞に被験物質を接触させる第一工程、

(2) 前記第一工程後に、レポーター遺伝子の発現量又はそれと相関する指標値をモニターする第二工程、及び

(3) 前記第二工程によりモニターされた発現量又はそれと相関する指標値の変化に基づき、前記物質が有する、三量体 G タンパク質 α サブユニット Gm1 をコードする遺伝子のプロモーターを介してシグナル伝達を調節する能力を評価する第三工程、を有することを特徴とする評価方法（以下、本発明評価方法と記すこともある。）；

1 1. 前項 1 記載のポリヌクレオチドと結合する物質の探索方法であって、

(1) 前項 1 記載のポリヌクレオチドと被験物質とを接触させる第一工程、

10 (2) 前記第一工程後に、当該ポリヌクレオチドと被験物質との複合体生成の有無を調べる第二工程、及び

(3) 前記第二工程で得られた複合体生成の有無の分析結果に基づき、当該ポリヌクレオチドと結合する物質を選抜する第三工程、

15 を有することを特徴とする探索方法（以下、本発明結合物質探索方法と記すこともある。）；

1 2. 前項 1 記載のポリヌクレオチドと結合する物質の精製方法であって、

(1) 前項 1 記載のポリヌクレオチドと試料とを接触させて、当該ポリヌクレオチドと、当該試料中に含有される当該ポリヌクレオチドと結合する物質との複合体を生成させる第一工程、及び、

20 (2) 前記第一工程後、生成させた複合体から、当該ポリヌクレオチドと結合する物質を単離する第二工程、

を有することを特徴とする精製方法（以下、本発明精製方法と記すこともある。）；

1 3. 前項 8 記載の形質転換細胞と、レポーター遺伝子の発現量又はそれと相関する指標値の測定試薬とを含む、三量体 G タンパク質 α サブユニット Gm1 をコードする遺伝子のプロモーターを介したシグナル伝達調節物質のスクリーニングキット（以下、本発明キットと記すこともある。）；

1 4. 前項 9 又は 1 1 記載の探索方法により得られる、三量体 G タンパク質 α サブユニット Gm1 をコードする遺伝子のプロモーターを介したシグナル伝達調節能力を

有する化合物若しくはその薬学的に許容される塩を有効成分として含み、当該有効成分が薬学的に許容される担体中に製剤化されてなることを特徴とする神経・精神疾患用医薬（以下、本発明医薬と記すこともある。）；
等を提供するものである。

5

図面の簡単な説明

図1は、本発明のGm1プロモーターが転写活性能を有することを示す図である。

図2は、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1の脳組織（大脳皮質、海馬、小脳）における発現を示す図である。

10 図3は、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1の精神疾患患者脳組織における発現を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明を詳細に説明する。

15 本発明で用いられる遺伝子工学的技術は、たとえば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」（1989）、Cold Spring Harbor Laboratory Press及びD. , M. , Glover著、DNAクローニング（DNA Cloning）、IRL発行、1985年などに記載されている通常の方法に準じて行うこと
20 ができる。

三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1は、大脳皮質、海馬、小脳の神経細胞で高く発現している。例えば、神経・精神疾患患者（統合失調症、躁鬱病、うつ病及び不安症）の脳では、当該Gm1の発現が低下している。Gタンパク質の発現量の低下
25 は、細胞外からのシグナルを細胞内に伝える機能の減衰を引き起こす。このことより、Gm1の発現量の低下が、これら神経・精神疾患（統合失調症、躁鬱病、うつ病および不安症）の症状に関わっていることが示唆される。

本発明ポリヌクレオチドは、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードす

る遺伝子においてコーディング領域の上流に位置する領域（約3.8 k b）の塩基配列を有するポリヌクレオチドであって、所謂プロモーターと呼ばれる調節遺伝子の一種である。当該ポリヌクレオチドの塩基配列は、例えば、 σ 因子を持つRNAポリメラーゼが結合してオペロンの転写を開始する部位であり、転写を促すために必要な塩基配列を含む。さらに、当該ポリヌクレオチドの塩基配列は、例えば、細胞型特異的もしくは組織特異的な制御を受けるプロモーター要素配列や、外来性のシグナルもしくは因子（例えば、転写活性化蛋白質）によって誘導されるプロモーター依存的遺伝子発現を引き起こすために十分なプロモーター要素配列を含んでいてもよい。

本発明ポリヌクレオチドを含有し、かつ当該ポリヌクレオチドの下流（3' 側）に、当該ポリヌクレオチドによって転写が制御されるレポーター遺伝子を含有するプラスミドが哺乳動物細胞に導入されてなる形質転換細胞は、レポーター遺伝子を含有し当該ポリヌクレオチドは含有しないプラスミドが導入されてなる形質転換細胞に比べて、レポーター遺伝子の発現量が高くなる。即ち、本発明ポリヌクレオチドは、例えば哺乳動物細胞において、その下流にある遺伝子の転写を制御する能力を有しており、よって、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能力を有する塩基配列を有するポリヌクレオチドである。

本発明ポリヌクレオチドとしては、具体的には例えば、以下の（1）～（4）のいずれかに記載される塩基配列を有するポリヌクレオチド等をあげることができる。

（1）配列番号1で示される塩基配列

（2）配列番号1で示される塩基配列における塩基番号603番から3871番で示される塩基配列（当該配列は、配列番号2で示される塩基配列に相当する塩基配列である。）

（3）上記（1）又は（2）の塩基配列において1個もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつ三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能力（以下、当該能力を本転写制御能力と記すこともある。）を有する塩基配列

（4）上記（1）又は（2）の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェン

トな条件下にハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的であり、かつ三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能力を有する塩基配列

- 5 例えば、本発明ポリヌクレオチドが有する塩基配列としては、本発明ポリヌクレオチドが有する三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能力を維持したまま、その一部分の塩基を欠失させて得られる（例えば、適当な制限酵素を用いて切り出すことにより調製される）ポリヌクレオチドの塩基配列をあげることもできる。そのような塩基配列の具体的な例としては、配列番号1で示される塩基配列における塩基番号100番から3871番で示される塩基配列、配列番号1で示される塩基配列における塩基番号200番から3871番で示される塩基配列、配列番号1で示される塩基配列における塩基番号300番から3871番で示される塩基配列、配列番号1で示される塩基配列における塩基番号400番から3871番で示される塩基配列、配列番号1で示される塩基配列における塩基番号500番から3871番で示される塩基配列等をあげることができる。また、前記のいずれかの塩基配列において1個もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつ三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能力を有する塩基配列や、前記のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下にハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的であり、かつ三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能力を有する塩基配列等をあげることもできる。
- 10
15
20

- 尚、このような本発明ポリヌクレオチドは、通常の遺伝子工学的な方法、例えば、「田村隆明著（羊土社刊）、新転写制御のメカニズム（2000年）」33～40頁、
- 25 「野村慎太郎、渡辺俊樹監修著（秀潤社刊）、脱アイソトープ実験プロトコル（1998年）」等に記載された方法に準じて作製すればよい。作製されたポリヌクレオチドが有する、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能力は後述する方法、例えば、当該ポリヌクレオチドを含有しかつ当該ポリ

ヌクレオチドの下流（3'側）にレポーター遺伝子を含有するプラスミドが導入されてなる形質転換細胞を用いたレポータージーンアッセイ等により確認することができる。

- 5 本発明において「ポリヌクレオチド」（オリゴヌクレオチドを含む）には、ポリヌクレオチドが有する塩基配列に相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドも含まれる。また「ポリヌクレオチド」には、特に言及しない限り、DNA及びRNAの双方が含まれる。

- 10 また「DNA」には、その塩基配列を有する1本鎖DNAの他に、それに相補的な1本鎖DNA、及び2本鎖DNAが含まれる。さらにまた、「DNA」には、特に言及しない限り、cDNA、ゲノムDNA及び合成DNAが含まれる。「RNA」には、特に言及しない限り、total RNA、mRNA、rRNA及び合成RNAが含まれる。

- 15 本発明において「転写活性を喪失しない改変」とは、例えば、既に同定されている各種の転写調節配列（即ち、転写を制御する能力を有する塩基配列）と相同性が低い部分について行うことができる改変等を意味するものである。このような改変を含む「1個もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列」において、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能力を損なうことなく、どの塩基を何個欠失、置換もしくは付加できるかの指標は、後述する方法により評価及び確認することができる。

- 20 このような改変は人為的に変異導入することによって作製してもよい。具体的には、例えば、A. Greener, M. Callahan, Strategies (1994) 7, 32-34等に記載される方法を用いてランダムに変異を導入することによって取得することができ、W. Kramer, et al., Nucleic Acids Research (1984) 12, 9441もしくはW. Kramer, H. J. Frits, Methods in Enzymology (1987) 154, 350等に記載のギャップド・デュプレックス (gapped duplex) 法、またはT. A. Kunkel, Proc. of Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1985) 82, 488もしくはT. A. Kun

kel, et al., Methods in Enzymology (1987) 154, 367等に記載のクンケル(Kunkel)法を用いて部位特異的に変異を導入することによって取得することができる。あるいは、配列番号1で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド等において、1ヶ所ないし数カ所の部分塩基配列を、
5 他のプロモーターのポリヌクレオチドの一部と入れ換えたキメラDNAを作製することによって取得することができ、それには例えば、S. Henikoff, et al., Gene (1984) 28, 351、C. Yanisch-Perron, et al., Gene (1985) 33, 103等に記載された方法を用いることができる。

10

本願において「ストリンジェントな条件下にハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、以下に示すポリヌクレオチドをいう。即ち、(1) 高イオン濃度下[例えば、6 X SSC (900 mMの塩化ナトリウムおよび90 mMのクエン酸ナトリウムを含有する) 等が挙げられる。] に、65℃の温度条件でハイブリダイズさせることに
15 よりポリヌクレオチド-ポリヌクレオチドハイブリッドを形成し、(2) 低イオン濃度下[例えば、0.1 X SSC (15 mMの塩化ナトリウムおよび1.5 mMのクエン酸ナトリウムを含有する) 等が用いられる。] に、65℃の温度条件で30分間洗浄した後でも当該ハイブリッドが維持されうるポリヌクレオチドをいう。

20

このようなポリヌクレオチドの塩基配列には、マウス由来の塩基配列に対応する他の生物種(例えばヒト及びラット)由来の塩基配列等が含まれる。このような塩基配列は、例えば、NCBIのblastサーチ(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)等により選抜することができる。具体的には例えば、配列番号3で示される塩基配列を有するGm1遺伝子の翻訳開始コドン付近の塩基配列を対象配列としたNCBIのblastサーチにより
25 、他の生物種のゲノム配列データベースから相同性の高い塩基配列を検索することができる。当該検索により選択された塩基配列の翻訳開始点より上流の塩基配列からなるポリヌクレオチドを選抜することにより、対応する他の生物種のプロモーター領域を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドを選抜することができる。選抜されたポリ

ヌクレオチドが有する、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能力は後述する方法により確認することができる。

5 本発明ポリヌクレオチドの調製方法としては、例えば、化学合成法、PCR、ハイブリダイゼーション法等が挙げられる。

化学合成法を用いて調製する場合、DNA自動合成機、例えばDNA合成機モデル380A（ABI社製）等を用いることができる。

次に、PCRを用いて本発明ポリヌクレオチドを調製する方法について説明する。

10 鋳型とするゲノムライブラリーは、例えば、「Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd edition」（1989）、Cold Spring Harbor Laboratory Press等に記載されている方法に準じてヒト、マウス、ラット等の哺乳動物の組織から調製することができる。また、ヒトゲノムDNA（クローンテック製）等の市販のゲノムDNAや、ヒトゲノムウォーカーキット（クローンテック製）等の市販ゲノムライブラリーを用いることができる。

15 次いで、増幅させるプロモーターに対応したプライマー、配列番号1で示される塩基配列を有する本発明ポリヌクレオチドを調製する場合であれば、例えば、配列番号1で示される塩基配列における塩基番号1番から20番で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号1における塩基番号3851番から3871番で示される塩基配列に対して相補的な塩基配列からなるプライマーと

20 を用いてPCRを行う。尚、かかるプライマーは、配列番号1で示される塩基配列に基づいて適宜設計することができ、また、その5'末端側に、制限酵素認識配列等を付加してもよい。前記のようにして増幅されたDNAは、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」（1989）、Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols In Molecular Biology」（1987）、John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常の方法に準じてベクター

25

にクローニングすることができる。具体的には例えばInvitrogen製のTA
クローニングキットに含まれるプラスミドベクターやStratagene製のp
Bluescript IIなどのプラスミドベクターを用いてクローニングするこ
とができる。クローニングされたポリヌクレオチドの塩基配列は、F. Sanger
5 , S. Nicklen, A. R. Coulson 著、Proceedings of
National Academy of Science U. S. A. (19
77), 74, 5463-5467等に記載されるダイデオキシターミネーティング
法などにより分析することができる。

10 次に、ハイブリダイゼーション法を用いて本発明ポリヌクレオチドを調製する方法
について説明する。

まず、プローブに用いるDNAを標識する。プローブに用いるDNAとしては、調
製しようとする本発明ポリヌクレオチドの塩基配列の少なくとも一部を有するポリ
ヌクレオチド、例えば、配列番号1で示される塩基配列における塩基番号603番か
15 ら3871番で示される塩基配列もしくはその一部の連続した塩基配列からなるポ
リヌクレオチドであってその鎖長が20塩基以上1000塩基以下であるポリヌク
レオチド、前記ポリヌクレオチドの塩基配列において1個もしくは複数個の塩基が欠
失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオ
チドとストリンジェントな条件下にハイブリダイズするポリヌクレオチド等を挙げ
20 ることができる。具体的には、配列番号1で示される塩基配列における塩基番号10
0番から3871番で示される塩基配列からなるDNA、配列番号1で示される塩基
配列における塩基番号200番から3871番で示される塩基配列からなるDNA、
配列番号1で示される塩基配列における塩基番号300番から3871番で示され
る塩基配列からなるDNA、配列番号1で示される塩基配列における塩基番号400
25 番から3871番で示される塩基配列からなるDNA、配列番号1で示される塩基配
列における塩基番号500番から3871番で示される塩基配列からなるDNA等
を挙げることができる。

プローブに用いる前記DNAは、例えば、化学合成法、PCR、ハイブリダイゼー

ション法等、「本発明ポリヌクレオチドの調製方法」として前述した通常のポリヌクレオチドの調製方法によって得ることができる。

プローブに用いる前記DNAを放射性同位元素により標識するには、例えば、ベリンガー製、宝酒造製のRandom Labelling Kit等を用いることができる、通常5のPCR反応組成中のdCTPを $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPに替えて、プローブに用いる前記DNAを鋳型にしてPCR反応を行うことにより、標識を行うこともできる。また、プローブに用いるDNAを蛍光色素又は酵素で標識する場合には、例えば、ECF Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System(Amersham Pharmacia Biotech製)又はAlkphos Direct DNA labeling and detection kit(Amersham Pharmacia Biotech製)等を用いることができる。10

プローブをハイブリダイズさせるDNAライブラリーとしては、例えば、マウス、ラットなどのげっ歯類や、ヒトなどの霊長類等の動物由来のゲノムDNAライブラリー15一等を使用することができる。

当該DNAライブラリーには、市販のゲノムDNAライブラリーを用いることもできるし、また「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常のライブラリー作製法に従い、例えば、Stratagene製の λ FIX II、 λ EMBL 3、 λ EMBL 4、 λ DASH II等の λ ベクターを用い、Gigapack packaging Extracts (Stratagene製)等をin vitroパッケージングに用いてゲノムDNAライブラリー25を作製し、これを用いることもできる。

ハイブリダイゼーション方法としては、コロニーハイブリダイゼーションやプラー

クハイブリダイゼーションをあげることができ、ライブラリーの作製に用いられたベクターの種類に応じて方法を選択するとよい。例えば、使用されるライブラリーがプラスミドベクターで構築されたライブラリーである場合には、コロニーハイブリダイゼーションを行うことができる。具体的にはまず、ライブラリーのDNAを宿主微生物に導入して形質転換細胞を取得し、得られた形質転換細胞を希釈して寒天培地にまき、コロニーが現れるまで37℃で培養を行う。また、使用されるライブラリーがファージベクターで構築されたライブラリーである場合には、プラークハイブリダイゼーションを行うことができる。具体的にはまず、宿主微生物とライブラリーのファージを感染可能な条件下で混合した後さらに軟寒天培地と混合し、これを寒天培地上にまく。その後、プラークが現れるまで37℃で培養を行う。より具体的には、例えば、Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis 著、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年) 2.60から2.65等に記載されている方法に準じて、NZY寒天培地に寒天培地1mm²当たり0.1~1.0 pfuの密度で、約 9.0×10^5 pfuのファージライブラリーを広げ、37℃で6~10時間培養する。

次いで、前記のいずれのハイブリダイゼーション法を用いた場合も、前述の培養を行った寒天培地の表面にメンブレンフィルターをのせ、プラスミドを保有する形質転換細胞やファージを当該メンブレンフィルターに転写する。このメンブレンフィルターをアルカリ処理した後、中和処理し、次いで、DNAを当該フィルターに固定する処理を行う。より具体的には例えば、プラークハイブリダイゼーションの場合には、クローニングとシーケンス：植物バイオテクノロジー実験マニュアル（渡辺、杉浦編集、農村文化社1989年）等に記載の通常の方法に準じて、前記寒天培地の上にニトロセルロースフィルター又はナイロンフィルター等、例えば、Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech製) を置き、約1分間静置してファージ粒子をメンブレンフィルターに吸着させる。次に、当該フィルターをアルカリ溶液（1.5 M塩化ナトリウム、0.5 N水酸化ナトリウム）に約3分間

浸してファージ粒子を溶解させてファージDNAをフィルター上に溶出させた後、中和溶液（1.5 M塩化ナトリウム、0.5 Mトリス塩酸、pH 7.5）に約5分間浸す処理を行う。当該フィルターを洗浄溶液（300 mM塩化ナトリウム、30 mMクエン酸ナトリウム、200 mMトリス塩酸）で約5分間洗った後、例えば、約80℃

5 で約90分間ベーキングすることによりファージDNAをフィルターに固定する。このように調製されたフィルターと、前記プローブとを用いてハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションを行う際の試薬及び温度条件は、例えば、D. M. Glover編「DNA cloning, a practical approach」 IRL PRESS（1985） ISBN 0-947946-18-

10 7、クローニングとシーケンス：植物バイオテクノロジー実験マニュアル（渡辺、杉浦編集、農村文化社1989年）、または、Molecular Cloning 2nd edition（J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis 著、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年）等に記載の方法に準じて行うことができる。例えば、4

15 50～900 mMの塩化ナトリウム、45～90 mMのクエン酸ナトリウムを含み、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を0.1～1.0%（W/V）の濃度で含み、変性した非特異的DNAを0～200 μ g/mLの濃度で含み、場合によってはアルブミン、フィコール、ポリビニルピロリドン等をそれぞれ0～0.2%（W/V）の濃度で含んでもよいプレハイブリダイゼーション溶液、好ましくは、900 mMの

20 塩化ナトリウム、90 mMのクエン酸ナトリウム、1%（W/V）のSDSおよび100 μ g/mLの変性Calf-thymus DNAを含むプレハイブリダイゼーション溶液を、前記のようにして作製したフィルター1 cm²当り50～200 μ Lの割合で準備し、当該溶液に前記フィルターを浸して42～68℃で1～4時間、好ましくは、45℃で2時間保温する。次いで、例えば、450～900 mMの塩化

25 ナトリウム、45～90 mMのクエン酸ナトリウムを含み、SDSを0.1～1.0%（W/V）の濃度で含み、変性した非特異的DNAを0～200 μ g/mLの濃度で含み、場合によってはアルブミン、フィコール、ポリビニルピロリドン等をそれぞれ0～0.2%（W/V）の濃度で含んでもよいハイブリダイゼーション溶液、

好ましくは、900 mMの塩化ナトリウム、90 mMのクエン酸ナトリウム、1% (W/V)のSDSおよび100 μ g/mLの変性Cal f - t h y m u s DNAを含むハイブリダイゼーション溶液と、前述の方法で調製して得られたプローブ（例えば、 32 P標識されたプローブをフィルター1 cm²当り $1.0 \times 10^4 \sim 2.0 \times 10^6$ c p m相当量）とを混合した溶液をフィルター1 cm²当り50～200 μ Lの割合で準備し、当該溶液にフィルターを浸し42～68℃で4～20時間、好ましくは、45℃で16時間保温しハイブリダイゼーション反応を行う。当該ハイブリダイゼーション反応後、フィルターを取り出し、15～300 mMの塩化ナトリウム、1.5～30 mMのクエン酸ナトリウム、および0.1～1.0% (W/V)のSDS等を含む42～68℃の洗浄溶液等、好ましくは、300 mMの塩化ナトリウム、30 mMのクエン酸ナトリウム、および1% (W/V)のSDSを含む55℃の洗浄溶液で、10～60分間のフィルター洗浄を1～4回、好ましくは15分間の洗浄を2回行う。さらに、フィルターを2×SSC溶液（300 mM塩化ナトリウム、および30 mMクエン酸ナトリウムを含む。）で軽くすすいだのち乾燥させる。このフィルターを、例えば、オートラジオグラフィーなどに供してフィルター上のプローブの位置を検出することにより、用いたプローブとハイブリダイズするDNAのフィルター上の位置を検出する。検出されたDNAのフィルター上の位置に相当するクローンをもとの寒天培地上で特定しこれを釣菌することにより、当該DNAを有するクローンを単離することができる。具体的には例えば、フィルターをイメージングプレート（富士フィルム）に4時間露光させ、次いで当該プレートをイメージングアナライザーBAS 2000（富士フィルム）を用いて解析し、シグナルを検出する。フィルターの作製に用いた寒天培地のうち、シグナルが検出された位置に相当する部分を約5 mm角にくり抜き、これを約500 μ LのSMバッファー（50 mMトリス-塩酸pH 7.5、0.1 M塩化ナトリウム、7 mM硫酸マグネシウム、および0.01% (W/V)ゼラチンを含む。）に2～16時間、好ましくは3時間浸してファージ粒子を溶出させる。得られたファージ粒子溶出液をMolecular Cloning 2nd edition（J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Pr

ess、1989年) 2.60から2.65に記載の方法に準じて寒天培地に広げ、37℃で6～10時間培養する。この寒天培地を用いて前述の方法と同様の方法でファージDNAをフィルターに固定し、このフィルターと前述のプローブを用いてハイブリダイゼーションを行う。フィルターの作製に用いた寒天培地のうちの、シグナルが検出された位置に相当する部分からファージ粒子を溶出し、これを寒天培地に広げ、前述の方法と同様にフィルターを作製し、ハイブリダイゼーションを行う。このようなファージクローンの特定と純化を繰り返すことにより、用いたプローブとハイブリダイズする塩基配列からなるDNAを含むファージクローンが得られる。

- 10 上述のようなハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行うことにより得られたクローンの保有するDNAは、DNA調製や解析が容易なプラスミドベクター、例えば市販のpUC18、pUC19、pBLUESCRIPT KS+、pBLUESCRIPT KS-等にサブクローニングして、プラスミドDNAを調製し、F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson著、Proceedings of National Academy of Science U. S. A. (1977), 74, 5463-5467等に記載されるダイデオキシターミネーティング法を用いてその塩基配列を決定することができる。塩基配列分析に用いる試料の調製は、例えば、Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年) 13.15等に記載されているプライマーエクステンション法に準じて行うことができる。また、ファージクローンをMolecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年) 2.60から2.65等に記載の方法に準じてNZYM液体培地で増幅し、ファージ液を調製して、これから例えば、Lambda-T RAPPLUS DNA Isolation Kit (Clontech製)等を用いてファージクローンDNAを抽出し、当該DNAを鋳型として、例えば、前述の

プライマーエクステンション法により塩基配列分析用の試料を調製し、塩基配列を分析することもできる。このようにして作製されたポリヌクレオチドが有する、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能力は、後述する方法により確認することができる。

5

本発明プラスミドの調製において、本発明ポリヌクレオチド（因みに、ここでの本発明ポリヌクレオチドはDNAを意味する。）が挿入されるプラスミドとしては、所望の細胞内で機能可能なプラスミドであれば良く、当該プラスミドが導入された細胞を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等）を含んでいてもよい。また、前記プラスミドにおいて、本発明ポリヌクレオチドおよび所望の遺伝子がプラスミド上で機能可能な形で連結されるような位置、例えば本発明ポリヌクレオチドが挿入される部位の下流に遺伝子挿入部位がさらに有ると、所望の遺伝子を細胞内で発現させるためのプラスミドの構築等に好ましく利用できる。ここで遺伝子挿入部位とは、例えば、遺伝子工学的手法で通常用いられる制限酵素が特異的に認識切断可能な塩基配列であり、本発明ポリヌクレオチドを有するプラスミド上に唯一存在する種類の制限酵素認識配列が好ましい。当該プラスミドとして具体的には、例えば、大腸菌を宿主とする場合にはpBR322（Boehringer Mannheim製）、pUC12、pUC118、pUC119（宝酒造製）等のpUC系プラスミド、pBluescript等、バチルス属細菌を宿主とする場合にはpUB110、pC194等が挙げられる。酵母を宿主とする場合にはYip5、Yep24等が挙げられる。昆虫細胞を宿主とする場合にはAcNPV等が挙げられる。動物細胞を宿主とする場合にはpUC18、pUC19等が挙げられる。

本発明ポリヌクレオチドの前記プラスミドへの挿入は、通常の方法、例えば「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」（1989）、Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols In Molecular Biology」（1987）、John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される方法に準じて

行うことができる。

本発明プラスミドのうち、本発明探索方法において用いられる形質転換細胞に導入されるプラスミドとしては、例えば、本発明ポリヌクレオチドの下流（3'側）に、
5 当該ポリヌクレオチドによって転写が制御されるポリヌクレオチドを含有するプラスミド、より具体的には、本発明ポリヌクレオチドを含有し、かつ当該ポリヌクレオチドの下流（3'側）に、当該ポリヌクレオチドによって転写が制御されるレポーター遺伝子を含有するプラスミド等をあげることができる。例えば、レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である場合には、本発明ポリヌクレオチドの制御下にルシフェラーゼ遺伝子を含む本発明プラスミドは、当該プラスミド中に含まれる本発明ポリ
10 ヌクレオチドの本転写制御能力を測定する場合に好ましく利用することができる。かかるプラスミドは、ルシフェラーゼ遺伝子を含む市販のプラスミド、例えば、pGL3-basic（Promega製）、PicaGene Basic Vector（東洋インキ製）等のプラスミドを使って作製することができる。具体的には、p
15 GL3-basicの遺伝子挿入部位に通常の方法により本発明ポリヌクレオチドを機能可能な形で挿入することにより、本発明ポリヌクレオチドの制御下にルシフェラーゼ遺伝子を含む本発明プラスミドを作製することができる。

本発明形質転換細胞（即ち、本発明ポリヌクレオチド又は本発明プラスミドが導入
20 されてなる形質転換細胞）の調製方法について以下に説明する。

本発明ポリヌクレオチド又は本発明プラスミドが導入される宿主細胞としては、大腸菌（例えばK12）、バチルス属細菌（例えばMI114）等の細菌、酵母（例えばAH22）、植物細胞、動物細胞等の細胞をあげることができ、本発明ポリヌクレオチド又は本発明プラスミドが細胞内で保持される細胞であればよい。本発明探索方法に用い
25 られる本発明形質転換細胞を調製するための宿主細胞としては、好ましくは動物細胞（例えばPC-12細胞、Neuro-2a細胞、IMR-32細胞、COS-7細胞、Vero細胞、CHO細胞、ES細胞等）、特に好ましくは神経細胞を挙げることができる。尚、宿主細胞がES細胞である本発明形質転換細胞とは、本発明ポリヌクレオチド又は本発明プラスミドが

導入されたES細胞を分化させた形質転換細胞や、ES細胞を分化した後、当該細胞に本発明ポリヌクレオチド又は本発明プラスミドが導入された形質転換細胞を含む。また本発明形質転換細胞は、これら形質転換細胞から発生させることにより作出された動物個体（即ち、形質転換動物）内に存在する状態での細胞をも含む。

5

本発明ポリヌクレオチド又は本発明プラスミドの宿主細胞への導入法としては、細胞に応じた導入方法を適用することができ、例えば動物細胞にはリン酸カルシウム法、電気導入法、DEAEデキストラン法、ミセル形成法などを適用することができる。具体的には例えば、リン酸カルシウム法としては、Grimm, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 10923-10927等に記載の方法を挙げることができ、電気導入法およびDEAEデキストラン法としては、Ting, A. T. et al., EMBO J., 15, 6189-6196等に記載の方法を挙げることができ、ミセル形成法としては、Hawkins, C. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 13786-13790等に記載の方法を挙げることができる。ミセル形成法としては例えば、リポフェクトアミン（GibcoBRL製）やフュージーン（Boehringer Mannheim製）等の市販の試薬を使用することも可能である。

10

15

20

本発明ポリヌクレオチドもしくは本発明プラスミドの導入処理を施した細胞を、例えば、本発明ポリヌクレオチドもしくは本発明プラスミドと同時に宿主細胞に導入された選抜マーカー遺伝子や、本発明プラスミドに含まれる選抜マーカー遺伝子等を利用し、当該選抜マーカー遺伝子に応じた選抜条件の培地で培養することにより、形質転換細胞を選抜することができる。

25

本発明は、本発明形質転換細胞に被験物質を接触させる工程を含む方法を提供している。即ち、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1のプロモーターを介したシグナル伝達調節物質の探索方法であって、

（１）本発明ポリヌクレオチドを含有しかつ当該ポリヌクレオチドの下流（3'側）にレポーター遺伝子を含有するプラスミドが導入されてなる形質転換細胞に被験物

質を接触させる第一工程、及び、

(2) 前記第一工程後に、レポーター遺伝子の発現量又はそれと相関する指標値をモニターする第二工程、

5 (3) 前記第二工程によりモニターされた発現量又はそれと相関する指標値の変化に基づき、前記物質が有する、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子のプロモーターを介してシグナル伝達を調節する能力を評価する第三工程、及び

10 (4) 前記第三工程で評価されたシグナル伝達調節能力に基づき、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子のプロモーターを介してシグナル伝達を調節する能力を有する物質を選抜する第四工程、
を有することを特徴とする探索方法（即ち、本発明探索方法）である。当該探索方法は、いわゆるレポータージーンアッセイを用いて、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子のプロモーターを介してシグナル伝達を調節する能力を有する物質を探索する方法である。

15

本発明探索方法に使用される細胞としては、哺乳動物細胞を宿主細胞とする本発明形質転換細胞が好ましく、例えば、PC-12細胞、Neuro-2a細胞、IMR-32細胞、Vero細胞、Hela細胞、CV1細胞、COS1細胞、CHO細胞、ES細胞等の公知の哺乳動物細胞を宿主細胞とする本発明形質転換細胞が特に好ましい。当該形質転換細胞は、上述のよう
20 にして調製すればよい。

上記の第一工程において、本発明ポリヌクレオチドを含有しかつ当該ポリヌクレオチドの下流（3'側）にレポーター遺伝子を含有するプラスミドが導入されてなる形質転換細胞と接触させる被験物質の濃度は、通常約0.001 μ M～約100 μ Mであればよく、約0.01 μ M～約10 μ Mが好ましく、約0.1 μ M～約10 μ Mが
25 より好ましい。当該細胞と被験物質とを接触させる時間は、通常、約1時間以上5日間程度であり、数時間から4日間程度が好ましい。好ましくは、18時間以上60時間程度であり、より好ましくは24時間から40時間程度が挙げられる。

当該細胞と被験物質との接触は、当該細胞が育成可能な条件で培養しながら行えばよい。例えば、哺乳動物細胞を宿主とする本発明形質転換細胞の場合には、適宜ウシ胎児血清等の哺乳動物由来の血清を添加したD-MEM、OPTI-MEM、RPMI 1640培地（Gibco-BRL製）等の市販の培地中で培養できる。培養は、
5 通常約30℃～約40℃、約2%（V/V）～10%（V/V）二酸化炭素存在下で実施すればよく、約35℃～約37℃、約4%（V/V）～約6%（V/V）二酸化炭素存在下で実施するのがより好ましい。

被験物質と接触させる際の当該細胞の細胞数は、例えば96ウェルプレートを用いる場合、通常約 1×10^4 個/ウェル～約 1×10^5 個/ウェルであればよく、約 5×10^4 個/ウェル～約 8×10^4 個/ウェルが好ましい。
10

上記の探索方法において、「レポーター遺伝子の発現量又はそれと相関する指標値をモニターする」方法としては、前記形質転換細胞中におけるレポーター遺伝子の発現量又はそれと相関する指標値を時間経過に沿って連続的に又は不連続に測定できる方法であればどのような方法であってもよい。例えば、レポーター遺伝子の発現産物、即ち当該遺伝子に対応するmRNAもしくは当該遺伝子にコードされる蛋白質を検出する方法（具体的にはノザンブロッティング、ウェスタンブロッティング等）を利用することができる。また、レポーター遺伝子として酵素遺伝子を用いる場合には、当該酵素の活性測定法等を利用すればよい。
15

より具体的には、レポーター遺伝子に対応するmRNAの量は、例えば、レポーター遺伝子の一部を含むポリヌクレオチドを用いたノーザンブロット法、RT-PCRなどによって測定することができる。レポーター遺伝子に対応する蛋白質の量は、レポーター遺伝子より産生されるタンパク質に対する抗体を用いて測定することができる。
20

また、レポーター遺伝子として酵素遺伝子を用いる場合には、「レポーター遺伝子の発現量と相関する指標値」として、産生された酵素の活性値を測定すればよい。使用され得るレポーター遺伝子としては、例えば、ルシフェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリフォスファターゼ（SEAP）遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェ
25

ラーゼ遺伝子、 β ガラクトシダーゼ遺伝子等、発現生成した蛋白質の活性の測定が容易であるものを好ましくあげることができる。ルシフェラーゼ遺伝子の発現量は、細胞溶解液に発光基質であるルシフェリン（例えば東洋インキ社製）を添加し基質の分解による発光をルミノメーター、液体シンチレーションカウンタ又はトップカウンタ等を用いて測定すればよい。アルカリフォスファターゼ遺伝子の発現量は、例えばLumi-Phos530（和光純薬社製）を用いて測定することができる。クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現量は、FAST CAT Chrolamphenicol Acetyltransferase Assay Kit（和光純薬社製）を用いて測定することができる。 β -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現量はAurora Gal-XE（和光純薬社製）を用いて測定することができる。

レポーター遺伝子としてGFP（Green Fluorescent Protein）遺伝子のように、当該遺伝子にコードされる蛋白質が蛍光等を発する場合には、産生された蛋白質が発する蛍光の量を測定すればよい。

前記のようにして、前記細胞と被験物質との接触および前記細胞における本発明ポリヌクレオチドの本転写制御能力の測定を行い、対照と比較して当該転写制御能力の上昇が検出された場合（例えば、30%程度、好ましくは50%程度、さらに好ましくは100%程度増加するような変化が認められた場合）または低下が検出された場合（例えば、30%程度、好ましくは50%程度、さらに好ましくは100%程度減少するような変化が認められた場合）には、当該被験物質を当該プロモーターに作用し当該転写制御能力を調節する物質、即ち、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子のプロモーターを介したシグナル伝達調節物質として選抜することができる。

被験物質の種類は特に限定されない。例えば、タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物（糖質、脂質等）、有機低分子化合物、無機低分子化合物、醃酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液等が挙げられる。

被験物質を接触させた後の細胞における、本発明ポリヌクレオチドと機能可能な形で連結されてなるレポーター遺伝子の発現量（以下、測定値1と記す。）を、被験物質を接触させなかった細胞における前記発現量（以下、測定値2と記す。）と比較することによって、当該被験物質の本転写制御能力を評価してもよい。この場合、本転写制御能力を、前記測定値を用いて、下記の式に従って転写制御率として求めるとよい。

$$\text{転写制御率 (\%)} = \{ (\text{測定値1} - \text{測定値2}) / \text{測定値2} \} \times 100$$

被験物質の本転写制御能力を表わす転写制御率が、統計学的に有意な値を示す物質、具体的に好ましくは、例えば、30%以上を示す物質、より好ましくは50%以上を示す物質を、本転写制御能力を有する物質として選抜する。

さらに上記の探索方法では、被験物質として異なる2種以上の物質を各々独立して用いた区におけるレポーター遺伝子の発現量の変化を比較することにより得られる差異に基づき前記物質の本転写制御能力を評価してもよい。このようにして評価された本転写制御能力に基づき本転写制御能力を有する物質を選抜することもできる。

さらにまた、前記異なる2種以上の物質のうち、少なくとも一つの物質を本転写制御能力を有さない物質（例えば、溶媒、バックグラウンドとなる試験系溶液等であってもよい。

）として、他方の被験物質が有する本転写制御能力を評価してもよい。また、前記異なる2種以上の物質のうち、少なくとも一つの物質が有する本転写制御能力を基準としながら他方の被験物質が有する本転写制御能力を評価してもよい。

本発明キットは、本発明ポリヌクレオチド（ここではDNA）を有する組み換えレポーターベクターを保持する試験細胞とレポーター活性の測定用試薬とを含むキットである。本発明キットは、さらに、本発明ポリヌクレオチド（ここではDNA）を有しないプラスミドが導入されてなる対照細胞を含んでいてもよい。このような対照細胞はネガティブコントロールとして利用することができる。当該キットは、上述した本

発明探索方法に使用できる。

上記のような探索方法により選抜された物質は、本発明ポリヌクレオチドの活性を制御し得ることから、本発明ポリヌクレオチドの制御下にある遺伝子の細胞内での発
5 現を制御することができる。よって、当該物質またはその薬学的に許容される塩は、それらを有効成分として含み、当該有効成分が薬学的に許容される担体中に製剤化されてなることを特徴とする転写制御剤として利用してもよい。当該物質は、例えば、当該遺伝子の翻訳産物の発現過多もしくは発現過少に起因する疾患のための医薬として有用である。また、当該物質は、本発明ポリヌクレオチドの制御下に連結した所
10 望の遺伝子、例えば神経・精神疾患との関連が推定される遺伝子等の、神経細胞における作用や、Gm1の発現量の異常又はGm1遺伝子のプロモーターを介したシグナル伝達の異常に起因する疾患（特に、神経・精神疾患）への影響を検討する際に転写調節剤として利用することもできる。

15 次に、本発明ポリヌクレオチドと結合する物質の探索方法について以下に説明する。

本発明ポリヌクレオチドと結合する物質の選抜方法は、本発明ポリヌクレオチドと被験物質とを接触させる第一工程、前記第一工程後に当該ポリヌクレオチドと被験物質との複合体生成の有無を調べる第二工程及び前記第二工程で得られた複合体生成
20 の有無の分析結果に基づき当該ポリヌクレオチドと結合する物質を選抜する第三工程を含む。

本発明ポリヌクレオチドと被験物質とを接触させる第一工程に使用されるポリヌクレオチドは、本発明ポリヌクレオチドを、例えば市販のDNA標識キットを用い、ラジオアイソトープ若しくは蛍光色素化合物で標識して用いると、当該ポリヌクレオ
25 チドと被験物質との複合体の検出が容易になる点で好ましい。本発明ポリヌクレオチドを放射性同位元素により標識するには、例えば、市販のR a n d o m L a b e l l i n g K i t等を用いることができる。通常のPCR反応組成中のdCTPを[α - 32 P] dCTPに替えて、本発明ポリヌクレオチドを鋳型にしてPCR反応を行

うことにより、当該ポリヌクレオチドを標識することもできる。また、本発明ポリヌクレオチドを蛍光色素で標識する場合には例えば、ECF Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System等を用いることができる。

- 5 本発明ポリヌクレオチドと被験物質とを、約4℃～約37℃、好ましくは約20℃～約30℃で、約5分間～約60分間、好ましくは約10分間～約30分間、適当なバッファー中、例えばTris、Hepes、MES等のバッファー中、好ましくはHepesバッファー中で接触させる。被験物質の濃度は通常約0.1 μ M～約1,000 μ Mであればよく、1 μ M～100 μ Mが好ましい。当該ポリヌクレオチドの
- 10 量は通常約1 fmol～約10 fmolであればよく、2 fmol～7 fmolが好ましい。

- 本発明ポリヌクレオチドと被験物質との複合体生成の有無を調べる方法としては、ゲルシフト法、フットプリント法、BIACORE法等を挙げることができる。被験
- 15 物質が比較的高分子量の化合物（例えばタンパク質、DNA等）の場合、ゲルシフト法、フットプリント法等を用いるとよい。被験物質が比較的低分子量の化合物の場合、BIACORE法、例えば「永田和宏・半田宏共著 生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法—BIACOREを中心に—シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社」記載の方法を用いるとよい。例えば、ゲルシフト法の場合、先ず本発明ポリヌ
- 20 クレオチドと被験物質との混合液を、通常の方法でポリアクリルアミドゲル電気泳動に供する。電気泳動後のポリアクリルアミドゲルを乾燥した後、例えば、オートラジオグラフィーなどに供してゲル上の当該ポリヌクレオチドの位置を検出することにより、当該ポリヌクレオチドと被験物質が結合しているかどうか調べることが出来る。

- 25 具体的には例えば、乾燥したゲルをイメージングプレートに約1時間～約1晩、より好ましくは6～8時間感光し、イメージングアナライザーで画像イメージを取得する。被験物質が当該ポリヌクレオチドと結合した場合、ポリヌクレオチド—被験物質複合体の移動度が遊離のポリヌクレオチドより小さくなり、画像イメージ上でバンド

のシフトが起こる。バンドのシフトが検出された場合の被験物質を、本発明ポリヌクレオチドと結合する物質として選抜することが出来る。

このようにして選抜される結合物質は、本発明ポリヌクレオチドに結合できることから、本発明ポリヌクレオチドの本転写制御能力を制御し得る。さらに、本発明ポリヌクレオチドの制御下にある遺伝子の細胞内での発現を制御し得る。よって、当該物質またはその薬学的に許容される塩は、それらを有効成分として含み、当該有効成分が薬学的に許容される担体中に製剤化されてなることを特徴とする転写制御剤として利用してもよい。当該物質は、当該遺伝子の翻訳産物の発現過多もしくは発現過少に起因する疾患のための医薬として有用である。また、当該物質は、本発明ポリヌクレオチドの制御下に連結した所望の遺伝子、例えば神経・精神疾患との関連が推定される遺伝子や行動や記憶との関連が推定される遺伝子等の、神経細胞における作用や、Gm1の発現量の異常又はGm1のプロモーターを介したシグナル伝達の異常に起因する疾患（特に、神経・精神疾患）や行動・記憶等への影響を検討する際に転写調節剤として利用することもできる。

本発明精製方法について以下に説明する。

本発明精製方法は、本発明ポリヌクレオチドと試料とを接触させて、当該ポリヌクレオチドと当該試料中に含有される当該ポリヌクレオチドと結合する物質との複合体を生成させる第一工程、及び、前記第一工程後、生成させた複合体から当該結合物質を単離する第二工程を含む。

本発明ポリヌクレオチドと試料とを接触させる際には、通常、当該ポリヌクレオチドを担体に結合させた形態で試料との接触を行うと、当該ポリヌクレオチドもしくは当該ポリヌクレオチドと結合物質との複合体を容易に回収できる点で好ましい。当該ポリヌクレオチドを結合させる担体の種類は特に限定されないが、例えば、市販のアフィニティークロマトグラフィー用担体、好ましくは臭化シアン活性化セファロース4B（Amersham Pharmacia Biotech製）等を使用することができる。当該ポリヌクレオチドを担体に結合させる場合には、当該ポリヌクレオ

チドを直接担体に結合させる方法と、スペーサーを介して結合させる方法がある。結合させる際の条件は、例えば、当該ポリヌクレオチドと臭化シアン活性化セファロース 4 B を混合し、約 4℃～約 10℃で 1 晩 1000 rpm で攪拌し、当該ポリヌクレオチドをセファロース上に固定する。ついで、未反応の臭化シアンの活性基を無くすために、アミノ基を持つ化合物を含んだバッファー、例えば、1 M グリシンを含む炭酸水素ナトリウム溶液中で、例えば約 4℃～約 10℃で 1 晩放置する。得られたゲルは、通常のバッチ法により試料と接触させてもよく、また、そのゲルを市販のクロマトグラフ管に充填することで、本発明ポリヌクレオチドと結合する物質用アフィニティーカラムを作製し、通常のカラムクロマトグラフィー法により試料と接触させてもよい。

例えば、カラムクロマトグラフィー法で接触・単離を行う場合、試料を前記したアフィニティーカラムに供し本発明ポリヌクレオチドとポリヌクレオチド結合物質の複合体を形成せしめた後、担体の洗浄、結合物質の溶出を通常の方法で行うことにより、結合物質を単離することができる。具体的には、まず試料を前記したアフィニティーカラムにロードし、次いで、ロードするときと同組成のバッファーでカラムを洗浄し、複合体を形成しなかった試料中成分を除去する。その後、バッファーに含まれる塩濃度を上昇させるグラジエント溶出を行って本発明ポリヌクレオチドと結合していた物質をカラムから溶出させることによって、本発明ポリヌクレオチドと結合する物質を単離することができる。溶出に使われる前記の塩は、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸等を挙げることができる。

本発明精製方法によって、本発明ポリヌクレオチドの本転写制御能力を制御する物質の上述の選抜方法によって選抜される物質又は本発明ポリヌクレオチドと結合する物質の上述の選抜方法によって選抜される物質を精製することができる。

25

本発明探索方法もしくは本発明結合物質探索方法により選抜される物質またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする転写制御剤は、その有効量を経口的または非経口的にヒト等の哺乳動物に対し投与することができる。例えば、経口的に投与す

る場合には、本転写制御剤は錠剤、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の通常の形態で 사용할 ことができる。また、非経口的に投与する場合には、本転写制御剤を溶液、乳剤、懸濁液等の通常の液剤の形態で 使用することができる。前記形態の本転写制御剤を非経口的に投与する方法としては、例えば注射する方 法、坐剤の形で直腸に投与する方法等を挙げることができる。

前記の適当な投与剤型は許容される通常の担体、賦型剤、結合剤、安定剤、希釈剤等に本探索方法により選抜される物質またはその薬学的に許容される塩を配合することにより製造 することができる。また注射剤型で用いる場合には、許容される緩衝剤、溶解補助剤、等張剤等を添加することもできる。

投与量は、投与される哺乳動物の年令、性別、体重、疾患の程度、本転写制御剤の種類、投与形態等によって異なるが、通常は経口の場合には成人で1日あたり有効成分量として約1mg～約2g、好ましくは有効成分量として約5mg～約1gを投与すればよく、注射の場合には成人で有効成分量として約0.1mg～約500mgを投与すればよい。

また、前記の1日の投与量を1回または数回に分けて投与することができる。

本転写制御剤の適用可能な疾患としては、Gタンパク質遺伝子のプロモーターを介したシグナル伝達の異常に起因する疾患（特に、神経・精神疾患）等をあげることができ、具体的には例えば、統合失調症、躁鬱病、うつ病及び不安症等の神経・精神疾患があげられる。これらの疾患を治療・改善・予防するために本転写制御剤を用いればよい。

実施例

以下、本発明をより詳細に説明するため、実施例を挙げて説明するが本発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例1 (マウスGm1プロモーター領域を含むポリヌクレオチドのクローニング)

マウスGm1プロモーター領域を含むポリヌクレオチドを以下のようにして単離した。

5 (1) フェージスクリーニング用プローブの作製

フェージライブラリーのスクリーニングを行なうために、以下に示す手順によってマウスGm1遺伝子の5'上流領域を含むプローブDNAを作製した。

マウスC57BL/6由来のゲノムDNA 1 μ gを鋳型に用い、10 μ MのフォワードプライマーmGmg-1 (5' tgttctcccgacccttcaggatcttcttt; 配列番号4)、10 μ M
10 のリバースプライマーmGmg-2 (5' -acctatgagcagcaatggatagagtctat; 配列番号5) およびTAKARATaqポリメラーゼ (TAKARALATaq with GC Buffer, 宝酒造社製) を用いてPCRを行うことにより増幅DNAを得た。

PCR条件は、95℃で30秒間、次いで60℃で30秒間、次いで72℃で2分間の保温を1サイクルとしてこれを35サイクル行った。

15 得られたDNAをアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN製) を用いて精製し、回収した。回収されたDNAをプローブ用鋳型DNAとして以下の実験で用いた。

次に当該プローブ用鋳型DNA 10 μ lと、Alkphos Direct DNA labeling and detectionキット (アマシャムバイオサイエンス社製) とを用い、当該キットに添付されたプロトコールに従って、アルカリフォスフォターゼでラベルされたプローブDNA
20 を調製した。

(2) ゲノムライブラリーのスクリーニング

マウス129/sv由来ゲノムライブラリー (STRATAGENE社製) を用い、以下の手
25 順でマウスGm1プロモーターの単離を行なった。

15 cmのNZYプレート20枚に1 x 10⁶ のフェージを播き、これを37℃で8時間培養することにより、プラークを形成させた。プラークが形成されたプレートにニトロセルロースメンブレンを接触させることにより、形成されたプラークをニト

ロセルロースメンブレン上に移した。このニトロセルロースメンブレンと、アルカリ
フォスフォターゼでラベルされたプローブDNAを、Alkphos Direct DNA labeling
and detectionキット（アマシャムバイオサイエンス社製）を用い、当該キットに添
付されたプロトコールに従って、ハイブリダイゼーションを行なった。またハイブリ
5 ダイゼーションによるシグナルの検出も、Alkphos Direct DNA labeling and detec
tionキット（アマシャムバイオサイエンス社製）を用い、当該キットに添付されたプ
ロトコールに従って行なった。

ハイブリダイゼーションによりシグナルが検出されたファージより、Wizard Lamb
da Prepsキット（プロメガ社製）を用い、その添付プロトコールに従って、DNAを回
10 収した。このようにして、マウスGm1プロモーター領域を含むポリヌクレオチドを
クローニングした。

実施例2 （マウスGm1プロモーター領域を含むレポーターベクターの構築）

マウスGm1プロモーター領域を有するポリヌクレオチドを含有するレポーター
15 ベクターであるpGL-Gm1、および、pGL-Gm1/SacIを以下のように
して作製した。

実施例1で得られたマウスGm1プロモーター領域を含むファージDNAをSacI
で消化した。得られた消化物をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extr
action kit（QIAGEN製）を用いて精製し、DNAを回収した。回収されたDNAを
20 インサートDNAとして以下の実験で用いた。pGL3をSacIで消化した後、アルカ
リフォスフォターゼ処理することにより、ベクターDNAを調製した。次いで、調製
されたベクターDNA50ngと上記インサートDNA10ngとをT4ライゲー
スを用いて連結することにより、Gm1プロモーターレポーターベクターpGL-G
m1/SacIを作製した。当該ベクターpGL-Gm1/SacIにおいては、配
25 列番号2で示される塩基配列（当該配列は、配列番号1における塩基番号603番か
ら3871番で示される塩基配列に相当する。）が、pGL3のSacI部位に挿入され
ている。

さらに、実施例1で得られたマウスGm1プロモーター領域を含むファージDNA

をNheIで消化した。得られた消化物をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN製) を用いて精製し、DNAを回収した。回収されたDNAをインサートDNAとして以下の実験で用いた。次いでpGL3をNheIで消化した後、アルカリフォスファターゼ処理することにより、ベクターDNAを調製した。

- 5 調製されたベクターDNA 50 ngとインサートDNA 10 ngとをT4ライゲースを用いて連結することにより、Gm1プロモーターレポーターベクターpGL-Gm1/NheIを作製した。次にpGL-Gm1/SacIをNdeIおよびXhoIで二重消化し、得られた消化物をアガロースゲル電気泳動した後、2kbのDNAをQIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN製) を用いて精製し、回収した。回収されたDNAをインサートDNAとして以下の実験で用いた。pGL-Gm1/NheIをNdeIおよびXhoIで二重消化した。得られた消化物(ベクターDNA) 50 ngとインサートDNA 10 ngとをT4ライゲースを用いて連結することにより、Gm1プロモーターレポーターベクターpGL-Gm1を作製した。当該ベクターpGL-Gm1においては、配列番号1で示される塩基配列が、pGL3のSacI部位とNheI部位との間に挿入
- 10
- 15 されている。

実施例3 (マウスGm1プロモーターの転写活性の測定)

実施例2で得られた本発明Gm1プロモーターの転写活性化能を以下のようにして測定した。

- 20 PC12細胞を96穴プレートの各ウェル内に 5×10^4 cells/wellで播種し、約24時間培養した。培養された細胞に実施例2で得られたGm1プロモーターレポーターベクターpGL-Gm1 (0.2 μ g) 又はpGL-Gm1/SacI (0.2 μ g) を、リポフェクション法を用いてトランスフェクションすることにより、試験細胞を調製した。尚、上記と同じように播種された細胞に、Gm1プロモーターを含有しない
- 25 レポーターベクター(pGL3; 0.2 μ g) を、リポフェクション法を用いてトランスフェクションすることにより対照細胞を調製した。

次いで、これらの細胞を37℃で24時間培養した後、ウェル内の培地を除き、PBS緩衝溶液で洗浄した。洗浄された細胞を細胞溶解液(ピッカジーンルシフェラーゼ

キット、東洋インキ製造社製）で溶解した後、ウェル内に発光基質（ピッカジーンルシフェラーゼキット、東洋インキ製造社製）を添加し、各ウェルの蛍光強度を、ルミノメーターを用いて測定した。対照として、対照細胞も同様にして蛍光強度を測定した。結果を図 1 に示す。

- 5 対照細胞のルシフェラーゼ活性を 100% として、試験細胞のルシフェラーゼ活性が 130% 以上を示す場合を、転写制御能を有するとした。

実施例 4 （脳組織における抗 Gm 1 抗体を用いた免疫染色）

- 10 脳における三量体 G タンパク質 α サブユニット Gm 1 タンパク質の発現分布の解析を、抗 Gm 1 抗体を用いて蛍光組織免疫染色法より行った。即ち、パラホルムアルデヒドを用いて固定されたマウス脳切片（Novagen 社製）を脱パラフィン処理した後、0.01M クエン酸溶液中でオートクレーブ処理（120℃、15 分）した。

- 次に、脳切片を、TSA キット # 12（モルキュラープローブ社製）に付属されたブロッキング試薬を用いて希釈された抗 Gm 1 抗体（1/100 希釈）中で、4℃で 15 1 時間インキュベーションした。次いで、当該脳切片を PBS 溶液で 2 回洗浄した後、TSA キット # 12（モルキュラープローブ社製）に付属された HRP ラベル抗ウサギ IgG 抗体中で、4℃で 1 時間インキュベーションした。次いで、脳切片を PBS 溶液で 2 回洗浄した後、TSA キット # 12（モルキュラープローブ社製）に付属されたチラミドシグナル増幅キットを用いて、当該キットに添付されたプロトコール 20 に従って、蛍光シグナルの検出を行なった。蛍光シグナルは蛍光顕微鏡を用いて観察された。結果を図 2 に示す。三量体 G タンパク質 α サブユニット Gm 1 タンパク質が、大脳皮質、海馬、小脳の神経細胞で高く発現していることが明らかとなった。

実施例 5 （精神疾患患者脳組織における抗 Gm 1 抗体を用いた免疫染色）

- 25 ヒト精神疾患患者の脳における三量体 G タンパク質 α サブユニット Gm 1 タンパク質の発現の解析を、抗 Gm 1 抗体を用いた組織免疫染色法により行った。

即ち、パラホルムアルデヒドを用いて固定されたヒト脳切片スライド LandMark Low Density Neuropsychiatric Tissue MicroArrays（Ambion 社製）を脱パラフィン処

理した後、0.01Mクエン酸溶液中でオートクレーブ処理（120℃、15分）した。

次に、脳切片を含むスライド（以下、「スライド」と略称する）を超純水で洗浄した後、3%過酸化水素水を含むメタノール中で、室温で10分間インキュベートした。

次にインキュベートされたスライドをTN溶液（0.1M Tris pH7.5, 0.15M NaCl
5）で3回洗浄した後、TSAビオチンシステムNEL700（PerkinElmer社製）に付属されたブロッキング試薬中で、室温で30分間インキュベートした。

次に、スライドをTSAビオチンシステムNEL700（PerkinElmer社製）に付属されたブロッキング試薬を用いて希釈された抗Gm1抗体（1/100希釈）中で、4℃で1時間インキュベーションした後、これをTN溶液（0.1M Tris
10 pH7.5, 0.15M NaCl）で3回洗浄した。

次に、スライドをTSAビオチンシステムNEL700（PerkinElmer社製）に付属されたブロッキング試薬に希釈されたHRPラベル抗ウサギIgG抗体（1/200希釈）中で、4℃で1時間インキュベーションした後、これをTN溶液（0.1M Tris pH7.5, 0.15M NaCl）で3回洗浄した。

次に、スライドをTSAビオチンシステムNEL700（PerkinElmer社製）に付属されたビオチン化チラミド増幅試薬中で、室温で10分間インキュベーションした後、これをTN溶液（0.1M Tris pH7.5, 0.15M NaCl）で3回洗浄した。

次に、スライドをTSAビオチンシステムNEL700（PerkinElmer社製）に付属された抗HRPラベル抗アビジン抗体中で、室温で30分間インキュベーションした後、これをTN溶液（0.1M Tris pH7.5, 0.15M NaCl）で3回洗浄した。
20

このようにして得られたスライドを、DABタブレット1錠（シグマ社製）を15ml超純水に溶かしたものをを用いて発色させた後、顕微鏡で観察した。結果を図3に示す。三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1タンパク質の発現が、神経・精神疾患（統合失調症、躁鬱病、うつ病及び不安症）の患者の脳で、健常者よりも低下して
25 いることが明らかとなった。

実施例6 （マウスGm1プロモーター領域を含むレポーターベクターの構築）

マウスGm1プロモーター領域の塩基配列を含有するレポーターベクターであるp

GL-Gm1/843-3900を以下のようにして構築する。

配列番号1の塩基番号843番から3871番で示される塩基配列の3'端に29塩基が付加されてなる塩基配列を有するDNAを増幅するために、実施例1で得られたマウスGm1プロモーター領域を含むファージDNA10ngを鋳型に使い、10 μ MのフォワードプライマーprmGmg-843 (5' -atcatcacaacaggaaagtaataaaa; 配列番号6) 、10 μ MのリバースプライマーprmGmg-3900 (5' -attgtgcatccttcgaacgtccca; 配列番号7) およびTAKARA LA Taqポリメラーゼ (TAKARA LA Taq with GC Buffer, 宝酒造製) を用いてPCRを行なう。

PCR条件は、95℃で30秒間次いで60℃で30秒間次いで72℃で2分間の保温を1サイクルとしてこれを35サイクル行なう。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN製) を用いて精製、回収する。回収されたDNAをインサートDNAとして以下の実験で用いる。

インサートDNA10ngとpDriveベクター (QIAGEN社製) 50ngとをT4ライゲースを用いて連結することにより、プラスミドpDrive-Gm1/843-3900を得る。

得られたプラスミドpDrive-Gm1/843-3900をMluIおよびSacIで二重消化した。得られた消化物をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN製) を用いて精製し、DNAを回収する。回収されたDNAをインサートDNAとして以下の実験で用いる。pGL3をMluIおよびSacIで二重消化する。得られた消化物 (ベクター) 50ngとインサートDNA10ngとをT4ライゲースを用いて連結することにより、Gm1プロモーターレポーターベクターpGL-Gm1/843-3900を作製する。

10 μ MのフォワードプライマーprmGmg-1232 (5' -tggtgccctcttctgggtgtgtct; 配列番号8) および10 μ MのリバースプライマーprmGmg-3900 (5' -attgtgcatccttcgaacgtccca; 配列番号7) を用いて、配列番号1の塩基番号1232番から3871番で示される塩基配列の3'端に29塩基が付加されてなる塩基配列を有するDNAを増幅し、上記と同様な手順で、マウスGm1プロモーター領域の塩基配列を含有するレポーターベクターであるpGL-Gm1/1232-3900を構築する。

10 μ MのフォワードプライマーprmGmg-1989 (5' -atgccatataacttgagtcacagtttgtg

aa ; 配列番号 9) および 10 μ M のリバースプライマー prmGmg-3900 (5' -attgtgcatc
cttcgaacgtccca ; 配列番号 8) を用いて、配列番号 1 の塩基番号 1 9 8 9 番から 3 8
7 1 番で示される塩基配列の 3' 端に 2 9 塩基が付加されてなる塩基配列を有する D
NA を増幅し、上記と同様な手順で、マウス Gm 1 プロモーター領域の塩基配列を含有
5 するレポーターベクターである pGL-Gm1/1989-3900 を構築する。

10 μ M のフォワードプライマー prmGmg-2937 (5' -ctcccgagccttcagggatcttcttt ;
配列番号 1 0) および 10 μ M のリバースプライマー prmGmg-3900 (5' -attgtgcatcct
tcgaacgtccca ; 配列番号 8) を用いて、配列番号 1 の塩基番号 2 9 3 7 番から 3 8 7
1 番で示される塩基配列の 3' 端に 2 9 塩基が付加されてなる塩基配列を有する DNA
10 を増幅し、上記と同様な手順で、マウス Gm 1 プロモーター領域の塩基配列を含有す
るレポーターベクターである pGL-Gm1/2937-3900 を構築する。

10 μ M のフォワードプライマー prmGmg-843 (5' -atcaacacacaggaagtaataaaa ; 配
列番号 6) および 10 μ M のリバースプライマー prmGmg-3776 (5' -agactgctccggttac
cgtaaatactgcct ; 配列番号 1 1) を用いて、配列番号 1 の塩基番号 8 4 3 番から 3 7
15 7 6 番で示される塩基配列を有する DNA を増幅し、上記と同様な手順で、マウス Gm
1 プロモーター領域の塩基配列を含有するレポーターベクターである pGL-Gm1/843-3
776 を構築する。

10 μ M のフォワードプライマー prmGmg-1232 (5' -tggtgccctcttcttggtgtgtct ; 配列
番号 8) および 10 μ M のリバースプライマー prmGmg-3776 (5' -agactgctccggttaccg
20 taaatactgcct ; 配列番号 1 1) を用いて、配列番号 1 の塩基番号 1 2 3 2 番から 3 7
7 6 番で示される塩基配列を有する DNA を増幅し、上記と同様な手順で、マウス Gm
1 プロモーター領域の塩基配列を含有するレポーターベクターである pGL-Gm1/1232-
3776 を構築する。

10 μ M のフォワードプライマー prmGmg-1989 (5' -atgccatatacttgagtcacagtttgtg
25 aa ; 配列番号 9) および 10 μ M のリバースプライマー prmGmg-3776 (5' -agactgctcc
ggttaccgtaaatactgcct ; 配列番号 1 1) を用いて、配列番号 1 の塩基番号 1 9 8 9 番
から 3 7 7 6 番で示される塩基配列を有する DNA を増幅し、上記と同様な手順で、マ
ウス Gm 1 プロモーター領域の塩基配列を含有するレポーターベクターである pGL-G

m1/1989-3776を構築する。

10 μ MのフォワードプライマーprmGmg-2937 (5' -ctcccgagccttcagggaatcttcttt ;
配列番号 1 0) および10 μ MのリバースプライマーprmGmg-3776 (5' -agactgctccgg
ttaccgtaaatactgcct ; 配列番号 1 1) を用いて、配列番号 1 の塩基番号 2 9 3 7 番か
5 ら 3 7 7 6 番で示される塩基配列を有するDNAを増幅し、上記と同様な手順で、マウ
スGm 1 プロモーター領域の塩基配列を含有するレポーターベクターであるpGL-Gm1
/2937-3776を構築する。

実施例 7 (マウスGm 1 プロモーターの転写調節領域の決定)

- 10 実施例 6 で得られたレポーターベクターを用いて、本発明のGm 1 プロモーターの
転写活性化能を以下のようにして測定する。

- PC12細胞を96穴プレートの各ウェル内に 5×10^4 cells/wellで播種し、約24時間
培養する。培養された細胞に実施例 6 で得られたGm 1 プロモーターレポーターベク
ター (pGL-Gm1/843-3900、pGL-Gm1/1232-3900、pGL-Gm1/1989-3900、pGL-Gm1/2937-
15 3900、pGL-Gm1/843-3776、pGL-Gm1/1232-3776、pGL-Gm1/1989-3776またはpGL-Gm1/2
937-3776 ; 各0.2 μ g) を、リポフェクション法を用いてトランスフェクションする
ことにより、試験細胞を調製する。尚、上記と同じように播種された細胞を用いて、
Gm 1 プロモーターを含有しないレポーターベクター (pGL 3 ; 0.2 μ g) を、
リポフェクション法を用いてトランスフェクションすることにより、対照細胞を調製
20 する。

- 次いで、この細胞を37℃で24時間培養した後、ウェル内の培地を除き、PBS緩
衝溶液で洗浄する。洗浄された細胞を細胞溶解液 (ピッカジーンルシフェラーゼキッ
ト、東洋インキ製造社製) で溶解した後、ウェル内に発光基質 (ピッカジーンルシフ
ェラーゼキット、東洋インキ製造社製) を添加し、各ウェルの蛍光強度を、ルミノメ
ーターを用いて測定する。対照として、対照細胞も同様にして蛍光強度を測定する。
25

対照細胞のルシフェラーゼ活性を100%として、試験細胞のルシフェラーゼ活性
が130%以上を示す場合を、転写調節能を有するとする。

実施例 8 (レポーター活性を指標としたスクリーニング)

PC12細胞を96穴プレートの各ウェル内に 5×10^4 cells/wellで播種し、約24時間培養する。培養された細胞に実施例2で得られたGm1プロモーターレポーターベクター (pGL-Gm1; 0.2 μ g) を、リポフェクション法を用いてトランスフェクションすることにより、試験細胞を調製する。

次いで、この細胞を約24時間培養した後、ウェル内の培地を除く。ウェル内に、新たに0.10mlの新鮮な培地を加えた後、さらに0.1nM~10nMの被験物質を添加し、これを37℃で24時間培養する。

次いで、ウェル内の培地を除き、PBS緩衝溶液で洗浄した。洗浄された細胞を細胞溶解液 (ピッカジーンルシフェラーゼキット、東洋インキ製造社製) で溶解した後、ウェル内に発光基質 (ピッカジーンルシフェラーゼキット、東洋インキ製造社製) を添加し、各ウェルの発光強度を、ルミノメーターを用いて測定する。対照として、被験物質を接触させない細胞についても同様にして発光強度を測定する。

被験物質を接触させない場合のルシフェラーゼ活性を100%として、被験物質を接触させた場合のルシフェラーゼ活性のパーセンテージが50%以下になる物質又は150%以上になる物質をシグナル伝達調節物質として選択する。

実施例 9 (レポーター活性を指標としたスクリーニング)

実施例2で得られた本発明のGm1プロモーターの転写活性化能を以下のようにして測定する。

PC12細胞を96穴プレートの各ウェル内に 5×10^4 cells/wellで播種し、約24時間培養する。培養された細胞に実施例2により得られたGm1プロモーターレポーターベクター (pGL-Gm1又はpGL-Gm1/SacI; 各0.2 μ g) を、リポフェクション法を用いてトランスフェクションすることにより、試験細胞を調製する。また、Gm1プロモーターを有しないレポーターベクター (pGL3; 0.2 μ g) を、リポフェクション法を用いてトランスフェクションすることにより、対照細胞を調製する。

次いで、これら細胞を約24時間培養した後、ウェル内の培地を除く。ウェル内に、

新たに0.10mlの新鮮な培地を細胞に加えた後、さらに0.1nM~10nMの被験物質を添加し、これを37℃で24時間培養する。

次いで、ウェル内の培地を除き、PBS緩衝溶液で洗浄した。洗浄された細胞を細胞溶解液（ピッカジーンルシフェラーゼキット、東洋インキ製造社製）で溶解した後、
5 、ウェル内に発光基質（ピッカジーンルシフェラーゼキット、東洋インキ製造社製）を添加し、各ウェルの発光強度を、ルミノメーターを用いて測定する。対照として、被験物質を接触させない細胞についても同様にして発光強度を測定する。

被験物質を接触させた場合と被験物質を接触させていない場合のルシフェラーゼ活性の比が対照細胞に比べて、試験細胞で1.3倍以上または0.7倍以下になる物質をシ
10 グナル伝達物質として選択する。

実施例10 （本発明ポリヌクレオチド結合物質の選抜）

実施例3に記載された本発明プラスミドpGL-Gm1 5μgを、XhoIおよびMluI各10Uを用いて20μLの反応液中で37℃で1時間消化する。制限酵
15 素消化反応液をアガロースゲル電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kitを用いてインサートDNAを精製する。得られたDNA1μg、
[α-³²P]dCTP（Amersham Pharmacia Biotech製）5μL、非標識ヌクレオチド（dATP, dTTP, dGTP）（宝酒造製）各1μL、10×klenow Buffer（宝酒造製）2μLおよびklenow
20 酵素（宝酒造製）1μLを加え蒸留水で合計20μLとし、37℃で1時間インキュベートすることで、標識されたDNAを得る。次に、未反応[α-³²P]dCTPと標識されたDNAとを分離するために反応液を10mMトリス塩酸、1mMEDTA（以後TE溶液と表記する。）で平衡化したProbe Quant G-50 Micro Columns（Amersham Pharmacia Biotech製）に供し、遠心分離（室温、1200rpm、1分間）を行い、標識されたDNAを溶出する。得られた溶出液の放射活性をシンチレーターで測定し、10⁴cpm/μLになるようTE溶液で希釈して標識DNA溶液を得る。次いで、5×バインディングバッファー（50mM HEPES-水酸化カリウム（pH7.8）、250

mM塩化カリウム、5mM EDTA (pH 8.0)、25mM塩化マグネシウム、50% (W/V) グリセロール、25mMジチオスレイトール、3.5mM PMSF、10 μ g/mL Aprotinin、10 μ g/mL Pepstatin、10 μ g/mL Leupeptin、および5mM sodium orthovanadateを含む。) 5 μ L、2 μ g/ μ L polydIdC 1.5 μ L、10 μ M被験物質5 μ Lおよび標識DNA溶液2 μ Lを混合し蒸留水で合計25 μ Lにする。該液を室温で30分間インキュベートした後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこなう。電気泳動後、ゲルをゲル板よりはがして、ワットマン3MMろ紙上にて80℃、1時間真空ポンプにて乾燥後、イメージングプレートに2時間感光後、BAS 2000で画像イメージを取得する。被験物質が標識DNAと結合し標識DNA-被験物質複合体が形成された結果、ゲル上での移動度が遊離の標識DNAより小さくなり、画像イメージ上のバンドのシフトが検出された場合の被験物質を本発明ポリヌクレオチドへの結合物質として選抜する。

15 実施例 11 (本発明精製方法による本発明ポリヌクレオチドへの結合物質の精製)

(1) 本発明ポリヌクレオチド結合物質精製用アフィニティーカラムの作製

本発明プラスミド pGL-Gm1 200 μ gをXhoI、MluI 各50Uを用いて200 μ Lの反応液中で37℃で1時間消化する。制限酵素消化反応液をアガロースゲル電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kitを用いて精製することにより該DNAを得る。2mLの臭化シアン活性化セファロース4Bに44 μ gの該DNAを加え、4℃で1晩1000rpmで攪拌し、該DNAをセファロース上に固定する。ついで、未反応の臭化シアンの活性基を無くすために、1Mグリシンを含む炭酸水素ナトリウム溶液 (pH 9.5) 20mLを加え4℃で1晩放置する。こうして得られたゲルを10 \times 300mmクロマトグラフ管 (イワキガラス製) に充填することで、本発明ポリヌクレオチドへの結合物質用アフィニティーカラムを作製する。

(2) 試料の調製

ヒト神経由来培養細胞 I M R - 3 2 を 1 5 c m シャーレ (ファルコン社製) 4 0 枚にシャーレあたり 1×10^7 個の細胞を撚き込む。1 0 % (W/V) F B S を添加した D - M E M 培地 (高グルコース) を用い、3 7 °C、5 % (V/V) 二酸化炭素存在下で二晩培養する。二晩後、培地を除去した後、1 5 m L のリン酸緩衝液でシャーレの器壁を 1 回洗浄した後、該シャーレにトリプシン - E D T A 溶液 (0 . 0 5 % (W/V) トリプシン、0 . 5 3 m M E D T A を含む。G i b c o 製) 2 m L を細胞が浸るように添加し、3 7 °C で 5 分間放置する。これに、F B S 含有培地をトリプシン - E D T A 溶液の約 1 0 倍量添加し、細胞懸濁液を得る。得られた細胞懸濁液を遠心分離 (室温、1 , 3 0 0 r p m、5 分間) し、上清を除去する。細胞沈殿を 1 5 m L のリン酸緩衝液に懸濁し、再度室温で 1 , 3 0 0 r p m、5 分間遠心分離し、上清を除去する。その後、細胞沈殿を氷冷した 1 0 m M H e p e s - 水酸化カリウム (p H 7 . 8)、1 0 m M 塩化カリウム、0 . 1 m M E D T A (p H 8 . 0) 溶液 (以下、バッファー A と記す。) 1 0 m L に懸濁する。1 0 分間氷上で冷却した後、4 °C、1 , 3 0 0 r p m、5 分間遠心分離する。上清を除去後、細胞沈殿を 3 0 m l のバッファー A で再懸濁し、ダウンスホモジナイザーペッスル B (W h e a t o n 製) を用いて氷上で冷却しながら細胞を完全に破碎する。得られた細胞破碎液を遠心分離 (4 °C、1 3 0 0 r p m、5 分間) し、上清を除去する。この沈殿を 5 0 m M H e p e s - K O H (p H 7 . 8)、4 2 0 m M 塩化カリウム、0 . 1 m M E D T A (p H 8 . 0)、5 m M 塩化マグネシウム、2 % (W/V) グリセロール溶液 (以下、バッファー B と記す。) 2 m L に懸濁する。4 °C で 3 0 分間ローテーターにて穏やかに回転させた後、遠心分離 (4 °C、2 4 0 0 0 g、3 0 分間) する。上清を回収し、蒸留水で 5 倍に希釈した希釈液を精製の試料とする。

(3) 単離の工程

上記 (2) で調製された試料を上記 (1) 記載のアフィニティーカラムにロードする。さらに、5 倍希釈したバッファー B 1 0 m L をロードすることにより、複合体形成しなかった試料中成分を除去する。その後、塩化カリウム濃度を 1 M まで上昇させるグラジエント溶出を行い本発明ポリヌクレオチドへの結合物質を溶出すること

によって、本発明ポリヌクレオチドへの結合物質を含む画分を得る。

産業上の利用の可能性

- 本発明により、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1のプロモーター領域である塩基配列を有することを特徴とするポリヌクレオチド等が提供可能となる。当該ポリヌクレオチド等は、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1のプロモーターを介したシグナル伝達調節物質の探索方法、当該探索方法により得られる、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1のプロモーターを介したシグナル伝達調節能力を有する化合物若しくはその薬学的に許容される塩を有効成分として含有してなることを特徴とする神経・精神疾患用医薬等の研究・開発に有用である。

配列表フリーテキスト

配列番号 4

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

15 配列番号 5

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 6

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 7

20 PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 8

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 9

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

25 配列番号 10

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 11

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

請求の範囲

1. 三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を有することを特徴とするポリヌクレオチド。

5

2. プロモーター領域の塩基配列が、以下の(1)～(4)のいずれかに記載される塩基配列であることを特徴とする請求項1記載のポリヌクレオチド。

(1) 配列番号1で示される塩基配列、

(2) 配列番号1で示される塩基配列における塩基番号603番から3871番で示

10

される塩基配列、

(3) 上記(1)又は(2)の塩基配列において1個もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつ三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能力を有する塩基配列、及び

(4) 上記(1)又は(2)の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェン

15

トな条件下にハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的であり、かつ三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子の転写を制御する能力を有する塩基配列。

3. 請求項1又は2記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とするプラスミド。

20

4. 請求項1又は2記載のポリヌクレオチドを含有し、かつ当該ポリヌクレオチドの下流(3'側)に、当該ポリヌクレオチドによって転写が制御されるポリヌクレオチドを含有することを特徴とするプラスミド。

25

5. 請求項1又は2記載のポリヌクレオチドを含有し、かつ当該ポリヌクレオチドの下流(3'側)に、当該ポリヌクレオチドによって転写が制御されるレポーター遺伝子を含有することを特徴とするプラスミド。

6. 請求項 1 又は 2 記載のポリヌクレオチドが導入されてなる形質転換細胞。

7. 請求項 3 又は 4 記載のプラスミドが導入されてなる形質転換細胞。

5

8. 請求項 5 記載のプラスミドが導入されてなる形質転換細胞。

9. 三量体 G タンパク質 α サブユニット Gm 1 をコードする遺伝子のプロモーターを介したシグナル伝達調節物質の探索方法であって、

- 10 (1) 請求項 8 記載の形質転換細胞に被験物質を接触させる第一工程、
(2) 前記第一工程後に、レポーター遺伝子の発現量又はそれと相関する指標値をモニターする第二工程、
(3) 前記第二工程によりモニターされた発現量又はそれと相関する指標値の変化に基づき、前記物質が有する、三量体 G タンパク質 α サブユニット Gm 1 をコードする
15 遺伝子のプロモーターを介してシグナル伝達を調節する能力を評価する第三工程、及び
(4) 前記第三工程で評価されたシグナル伝達調節能力に基づき、三量体 G タンパク質 α サブユニット Gm 1 のプロモーターを介してシグナル伝達を調節する能力を有する物質を選抜する第四工程、
20 を有することを特徴とする探索方法。

10. 物質が有する、三量体 G タンパク質 α サブユニット Gm 1 をコードする遺伝子のプロモーターを介したシグナル伝達調節能力を評価する方法であって、

- (1) 請求項 8 記載の形質転換細胞に被験物質を接触させる第一工程、
25 (2) 前記第一工程後に、レポーター遺伝子の発現量又はそれと相関する指標値をモニターする第二工程、及び
(3) 前記第二工程によりモニターされた発現量又はそれと相関する指標値の変化に基づき、前記物質が有する、三量体 G タンパク質 α サブユニット Gm 1 をコードする

遺伝子のプロモーターを介してシグナル伝達を調節する能力を評価する第三工程、
を有することを特徴とする評価方法。

1 1. 請求項 1 記載のポリヌクレオチドと結合する物質の探索方法であって、

- 5 (1) 請求項 1 記載のポリヌクレオチドと被験物質とを接触させる第一工程、
(2) 前記第一工程後に、当該ポリヌクレオチドと被験物質との複合体生成の有無を
調べる第二工程、及び
(3) 前記第二工程で得られた複合体生成の有無の分析結果に基づき当該ポリヌクレ
10 オチドと結合する物質を選抜する第三工程、
を有することを特徴とする探索方法。

1 2. 請求項 1 記載のポリヌクレオチドと結合する物質の精製方法であって、

- (1) 請求項 1 記載のポリヌクレオチドと試料とを接触させて、当該ポリヌクレオチ
ドと、当該試料中に含有される当該ポリヌクレオチドと結合する物質との複合体を生
15 成させる第一工程、及び、
(2) 前記第一工程後、生成させた複合体から、当該ポリヌクレオチドと結合する物
質を単離する第二工程、
を有することを特徴とする精製方法。

- 20 1 3. 請求項 8 記載の形質転換細胞と、レポーター遺伝子の発現量又はそれと相関
する指標値の測定試薬とを含む、三量体 G タンパク質 α サブユニット Gm1 をコード
する遺伝子のプロモーターを介したシグナル伝達調節物質のスクリーニングキット。

- 1 4. 請求項 9 又は 1 1 記載の探索方法により得られる、三量体 G タンパク質 α サ
25 ブユニット Gm1 をコードする遺伝子のプロモーターを介したシグナル伝達調節能
力を有する化合物若しくはその薬学的に許容される塩を有効成分として含み、当該有
効成分が薬学的に許容される担体中に製剤化されてなることを特徴とする神経・精神
疾患用医薬。

1/3

図面

図 1

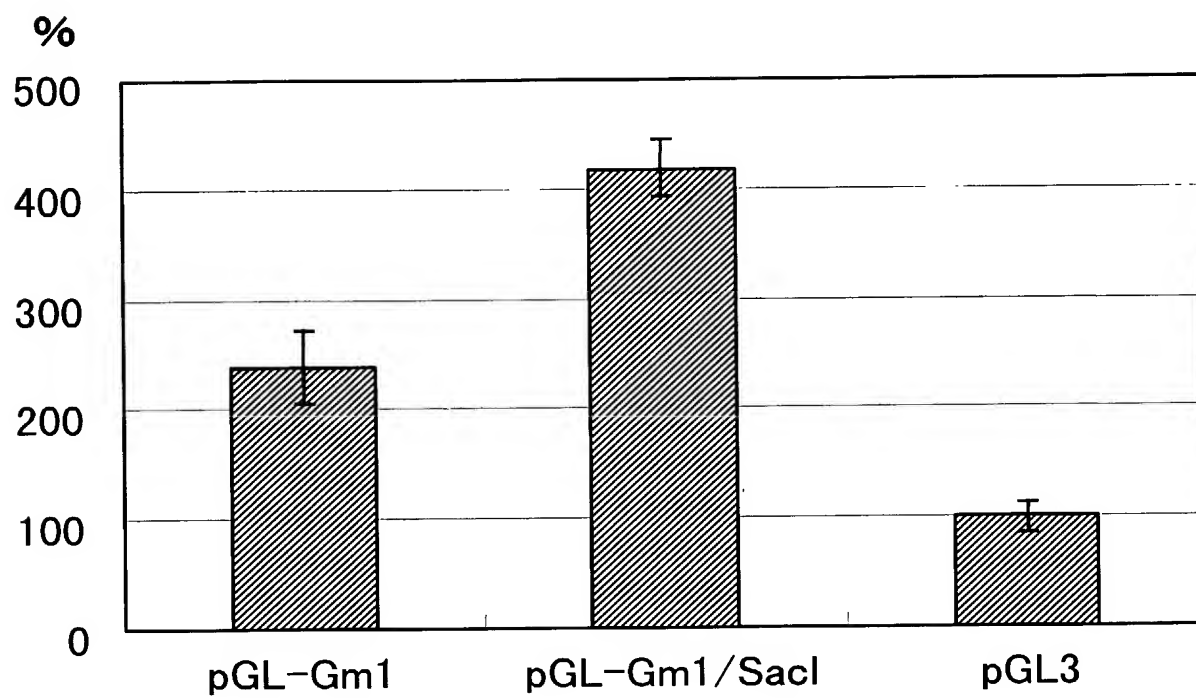
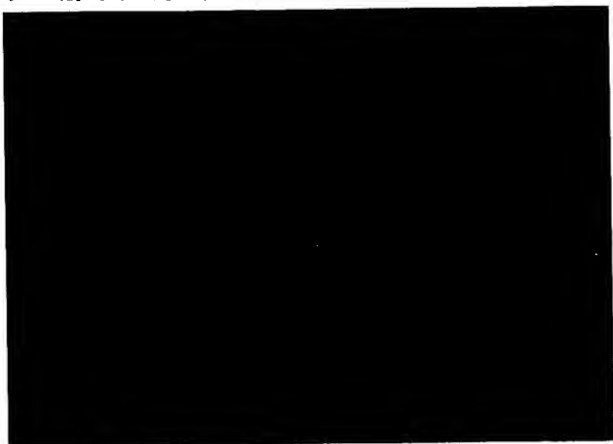
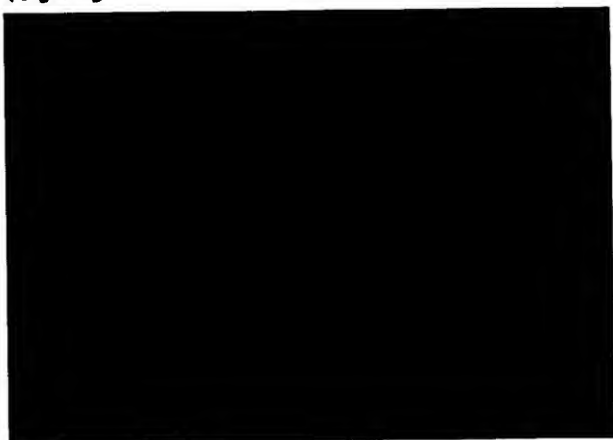


図 2

大脳皮質



海馬



小脳

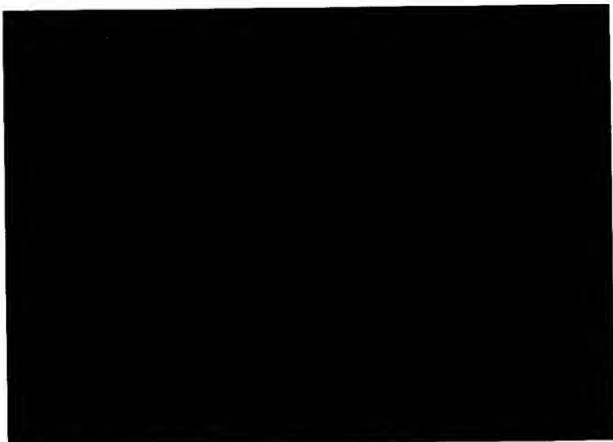
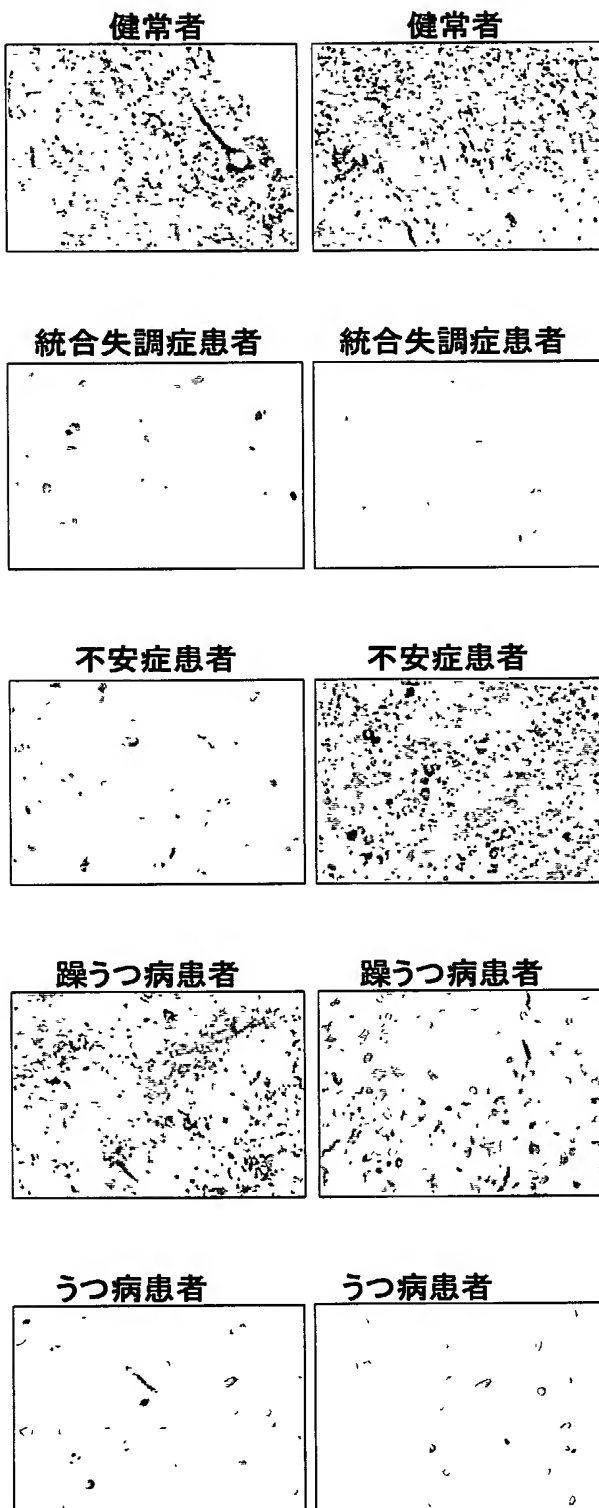


図 3



1/9

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED

<120> Gm1 promoter and use thereof

<130> S11530W001

<150> JP 2004-072244

<151> 2004-03-15

<160> 11

<210> 1

<211> 3871

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 1

```
gctagcccca alatatatat gcagcacatg cactcctgat acctgcagaa gccagaagag 60
ggaattggat cccctgtaat tggagttaca aatggttgtg agtggcaatg tggggacggg 120
gaaccacaggc tgcacatga gcagcaagtg ctcttaactg ctgagccatc tcttcagccc 180
taaaaataaa atgtttattt tacaigtatg aatgcctctg ctctatgca catcagaaag 240
ggaaccagat ctcatacagg atgggttgta agccaccatg tggttctcgg gaatggaact 300
caggacctct ggaagaacac ccagtgcttt taaccaciga gccatctctt taggccccat 360
aaagtaattt tgaacaaag aaaatgaatg cttaatgtca gctgactgtt aaagtgtgct 420
gtcaacctg gagctcgggt gatatagcag ggtcaacctc ttttagttac tttctattg 480
```

2/9

cigtgacaaa atgccaatgac caacacaact tacagaagaa agagtttaat tgacttacag 540
tttcaacagg ttagagtcga taatggigga gcaaaggcat gggiggcagc aggaacagct 600
gagagctcac atctcaaacc acaagcagga agtaaaacta gcctgaagac tglgttaate 660
tttiggaaact tcatiggcag gaagccgggg cacaccaaag cctccigtca tccccagggc 720
gcacitcttg ccttcggcct gggaglgag atgtaagctc tcagctgcct gcttcgcca 780
tagacttcag ccttcaggaa atgtaagcct actttttctc gtttataact catggigtit 840
ttatcatcac aacaggaaaag taataaaagt cgttttatag tiacaaatta aattagctgc 900
attcaaatc tttgtaactg ataatacata ttaagggca tgaigtatg tgaatgtat 960
attttacaca glacataggi taaataaagc atgggcatga tctcatagt acttttatgt 1020
tgaaggcact acttgctgc cttcaagact ctgtgacat aagatagagt atggctgita 1080
ctccaaagaa accaaaacac taaaattaga aactaccata tcagggctag agagatggct 1140
cagcggttaa gagcactgac tgcctctccg aaggctciga gttcaaatc cagcaaccac 1200
atggiggctc acaaccatct gtaatgggat ctggtgccct ctcttggtgt gctacaacc 1260
atctgtaatg ggatctggig cctctctctg gtgtgtctga agacagctag agtgtactta 1320
gctataataa aaaataaatc tttgggccag agcaaccaga ggicctgtat tcaattccca 1380
gcaaccacat gatggctcac aacctgtaca gctacaggt gctcacatac ataataataa 1440
taataaate tagagaaaaa aaagagagag aaagaaacta ccatacttg gtcgatgaga 1500
aggcacaatt agaaaaggcc tgaccagaat gacctiggig gaagaagggg cccagcttca 1560
aaaattgtgc tctgaactgg gcagtggtag cacatgccit taatcccaga ggcaggcaga 1620
ttctgagtt cacggccagc ttggtctaca gagtgaagtc cagaacagcc aggactatac 1680
agaaaaacc tgtctcaaaa agctaaaaa aataaataa aataaaaatg tgcctgatac 1740
tctacatgca tgccatggca aggaggcacg tgcattcata tacatacata ttacataaa 1800
acatttttaa atgtattaga gctacatat gacctagcca tctattacca ggtatatac 1860
tagtaggcta gcagaaagcc taatgccagg agtacattac ttttttggc ctgttggtc 1920
cctgaagtc caaaagcacc cccaactta aaagccagla ttgtgtctc tggctgccc 1980
tctgaagat gccatatact tgagtcacag tttgtgaaga aattgggctg gccctactga 2040
cagcttcatc tctatggct agctttctta ggaagggtgt aagcatgcta caggagggtc 2100
gaggaagtta tctctaggig tgtgtgtgtg agagagagag agagagagac agacagacag 2160

acagatagac agacagacag acagacagac acagacagac aggagagtag ggggtgggga 2220
ggggaggggg agagggagag agaccaagaa ttcatgcagg gaggaagag aagagggaaa 2280
tgatataatc acccaatttt tttaaaagia cccccctc cctctctcc cataaaagaa 2340
gtcttcaccc ttaccctct agccttctc tacgtgcttt tttgtttgtt tgtttgtttg 2400
ttttggagag aggtgtgttt tggtttttt gaggcagagt ttctctgtgt agccctggct 2460
gtcactctgt agaccaggct ggcctcgaac ttgcctccc cagtgtctggg attaaaagcg 2520
tgtgccacca cgactccagg ccttagaagc cagagacttg tggctccagg tgtgtccct 2580
gccccccag ggtccaacca caagcagct ggcactctgc atcctgtgac actctctgcc 2640
cttgagtac acaacaaca caggcagcag cggtagtgt cagctagtat tagggccctg 2700
gagaacttcc cattgagact ctccactcct atcttacagt gacctgaaa ttatagctct 2760
gaagcagacc tgaagtatct accctcagtc ctgagggcg ggcagctcca gtgacccag 2820
ctcctctatt tttcttttt ttacttttc atagccttcc tcttccaac tctggcttgt 2880
cacctctgcc ttccgacct gccctcccc actgggctc aggagctgct ggtggttgt 2940
ctcccgagcc ttcaggatc ttctttgaca tagcggattg tcccactat tgtttctagc 3000
taagctggat gtatccatga taaagatcac acgcaggcaa ggaaagacca ttccgggaat 3060
cctttttatt agacctaatg tcgcaatacc atggaacaaa cgtgaaaagt agccgaaccc 3120
ccaatttata tagcccgag aaaggcatgg taaggatgca tcatgtaagt gaagaattgt 3180
atttgccccg atcccagcac agcctccagt tccacggccc tggcctctta ctgcttcccc 3240
tctgtctgta aatgagaaga gcttccaggt catctaatag ccaccaaatc ctatcttgct 3300
gaagatactg tcttccaaag ctggcaaggg atgtctgcag tgatggtcac ggctggaatc 3360
aaggccttct ggatccggag tctttgctc agttgccgtt atccattcag ctgggtgtgtg 3420
tcaccgggct ttttaagtga cagagcagga tgcgttttaa tatcttcca gctccaagct 3480
gccaagctta agggaaacagt ctgtcgata gactctatcc attgctgtc ataggtctca 3540
ccaacctct ctgggagtt ttgtcactc atagaaacta acattttcaa cagtgtttaa 3600
caatgtcca tctgtcccca gcaccgtagg tcgcttagtc tctggctcag ccttagctag 3660
tggtaaccta accatccctg caacaaggca aggagtctg cccggcactt atgataggca 3720
gccagggtac caatacttgc cacaggaggc agtatctacg gtaaccggag cagtctgcgc 3780
ggcggtttta cggtaagggg gggggggggg gcgggctggc caaggccctt ggtcagctcc 3840

gcctgcttgg ggcgctctca ggtgcgagct c

3871

<210> 2

<211> 3279

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 2

gagctcacat ctcaaaccac aagcaggaag taaaactagc ctgaagactg tggttaatctt 60
ttggaacttc attggcagga agccggggca caccaaagcc tctgttcac cccagggcgc 120
actctctgcc ttggcctgt ggatggagat gtaagctctc agctgcctgc ttctgccata 180
gacttcagcc ctcaggaaat gtaagcctac tttttctcgt ttataactca tgggtgtttt 240
atcatcacia caggaaagta ataaaagtcg ttttatagtt acaaattaaa ttagctgcat 300
tcaaattctt tgtaactgat aatacatatt taagggcatt atgtaatgtg taatgtatat 360
tttacacagt acataggtta aataaagcat gggcatgac tcatagtgac ttttatgttg 420
aaggcactac ttgtgctcct tcaagactct tgtgacataa gatagagtat ggtcgttact 480
ccaaagaaac caaaacacta aaattagaaa ctaccatatt agggctagag agatggctca 540
gcggttaaga gcaactgactg ctcttccgaa ggtcctgagt tcaaatacca gcaaccacat 600
ggtggctcac aaccatctgt aatgggatct ggtgccctct tctggtgtgt ctacaacat 660
ctgtaatggg atctggtgcc ctcttctggt gtgtctgaag acagctagag tgtacttagc 720
tataataaaa aataaatctt tgggccagag caaccagagg tctgtattc aattcccagc 780
aaccacatga tggctcacia cctgtacagc tacagtgtgc tcacatacat aatataaata 840
aataaatcta gagaaaaaaa agagagagaa agaaactacc atacttttgt cgatgagaag 900
gcacaattag aaaaggcctg accagaatga ctttggtgga agaagggggc cagcttcaaa 960
aattgtgctc tgaactgggc agtggttagca catgccctta atcccagagg caggcagatt 1020
tctgagttca cggccagctt ggtctacaga gtgagttcca gaacagccag gactatacag 1080
aaaaaccctg tctcaaaaag ctaaaataaa taaataaaaa taaaaatgtg ctctgatctc 1140
tacatgcatg ccatggcaag gaggcacgtg catgcatata catacatatt tacataaaac 1200

atttttaaatt gtattagagc taccatatga cctagccatc tattaccagg tatatatcta 1260
gtaggctagc agaaagccia atgccaggag tacattactt cttttggact tgttgggtccc 1320
tgaagtccca aaagcacccc caactttaaa agccagtatt ggtgctcctg gctgccccctc 1380
ctgaagatgc catatacttg agtcacagtt tgtgaagaaa ttgggctggc cctactgaca 1440
gcttcatctc tatitggctag ctttcttagg aagggtgctaa gcatgctaca ggagggtga 1500
ggaagttata tctagggtgt tgtgtgtgag agagagagag agagagacag acagacagac 1560
agatagacag acagacagac agacagacac agacagacag gagagtaggg ggtggggagg 1620
ggagggggag agggagagag accatgaatt catgcaggga ggaaagagaa gagggaaatg 1680
atataatcac ccaatTTTT taaaagtact cccctctccc tctcttccca taaaagaagt 1740
cttcaccctt taccctctag ctttcttcta cgtgcttttt tgtttgtttg tttgtttgtt 1800
ttggagagag gtgtgttttg gtttttttga ggcagagttt ctctgtgtag ccttggctgt 1860
cactctgtag accaggctgg cctcgaactt tgcctccca gtgctgggat taaaagcgig 1920
tgccaccag actccaggcc ttagaagcca gagacttgtg gctccagggtg tgctccctgc 1980
ccctccaggg tccaaccaca agcagcctgg cactctgcat cctgtgacac tctctgccct 2040
tgagtgacac aacaacaaca ggcagcagcg gttagtgtca gctagtatta gggccctgga 2100
gaacttccca ttgagactct ccactcctat cttacagtga ccatgaaatt atagctctga 2160
agcagacctg aagtatctac cctcagtcct gaggggcggg cagctccagt gacccagct 2220
cctctatitt tctttttttt cacttticat agccttccct cttccaactc tggcttgtca 2280
cctctgccct cggacactgc ccttccccac tgggcctcag gagctgctgg tggttgctct 2340
cccgagcctt cagggatctt ctttgacata gcggattgtt cccactattg ttcttagcta 2400
agctggatgt atccatgata aagatcacac gcaggcaagg aaagaccatt cggggaatcc 2460
tttttattag acctaatgtc gcaataccat ggacacaacg tgaaaagtag ccgaaccccc 2520
aatttatata gcccgagaa aggcattgta aggatgcac atgtaagtga agaattgtat 2580
ttgccccgat ccagcacag cctccagttc caggccctg gcctcttact gcttccccctc 2640
ctgctgtaaa tgagaagagc ttccagggtc tctaatagcc accaaatcct atcttgcctga 2700
agatactgtc ttccaaagct ggcaagggat gtctgcagtg atggtcacgg ctggaatcaa 2760
ggccttctgg atccggagtc ttgtcttcag ttgccgttat ccattcagct ggtgtgtgtc 2820
accgggcttt taagtgtaca gagcaggatg ctgtttaata tcttcccagc tccaagctgc 2880

6/9

caagcttaag ggaacagtct gtcggataga ctctatccat tgctgctcat aggtctcacc 2940
aaccctctct tgggagtttt gtcactcat agaaactaac attttcaaca gtgtttaaca 3000
atgctccatc ctgccccagc accgtaggtc gcttagtctc tggctcagcc ctagctagtg 3060
gtaacctaac catccctgca acaaggcaag gagtctgccc cggcacttat gataggcagc 3120
cagggtacca atacttgcca caggaggcag tatttacggt aaccggagca gctgcgcgcg 3180
cggttttacg gtaagggggg gggggggggc gggctggcca aggcccttgg tcagctccgc 3240
ctgcttgggg cgctctcagg tgcgagctc 3279

<210> 3

<211> 360

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 3

atgggcctat gctacagcct gcggccgctg ctcttcggga gcccagagga caccctgtgt 60
gcggcctcgg aaccctgcgc agaggatgct cagcccagcg ccgccccggc ccttgccctcg 120
atcccagccc cggctcccggt agggaccctg ctccggcgctg gcggcggccg gatcgctcgcg 180
aacgcgcggc cgccaggcga gctgcagagc cgccggcgac aggagcagct acgagccgag 240
gagcgcgagg cggctaaaga ggcgaggaaa gtcagccggg gcatcgaccg catgctgcgc 300
gagcagaagc gggacctgca gcagacgcac cggctcctgc tgctgggggc tggtagagtc 360

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 4

tggtctcccg acccttcagg gatcttcttt

30

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 5

acctatgagc agcaatggat agagtctat

29

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 6

atcatcaca caggaaagta ataaaa

26

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 7

attgtgcatc cttcgaacgt ccca

24

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 8

tggtgccctc ttctggtgtg tct

23

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 9

atgccatata cttgagtcac agtttgtgaa

30

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 10

ctcccgagcc ttcaggatc ttcttt

26

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 11

agactgctcc ggttaccgta aatactgcct

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005077

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/11, A61K45/00, A61P25/18, 25/22, 25/24, C12N1/15, 1/19,
1/21, 5/10, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15, 33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/11, A61K45/00, A61P25/18, 25/22, 25/24, C12N1/15, 1/19,
1/21, 5/10, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15, 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq,
Caplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1382613 A1 (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 21 January, 2004 (21.01.04), & JP 2004-350672 A & CA 2432968 A	1-13
A	JP 2002-034575 A (Shiseido Co., Ltd.), 05 February, 2002 (05.02.02), & WO 2002/010376 A1 & EP 1306432 A1	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 May, 2005 (26.05.05)

Date of mailing of the international search report

14 June, 2005 (14.06.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005077

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 14
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
With respect to "compounds capable of regulation of signal transmission by means of promoter of gene coding for trimer Gprotein α -subunit Gm1, obtained by the screening method of claim 9 or 11" claimed in claim 14, what particular (continued to extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005077

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)

compounds are involved or not involved therein is utterly ambiguous. Thus, claim 14 is extremely unclear, and consequently no meaningful opinion as to the novelty, inventive step and industrial applicability of the invention claimed in claim 14 cannot be presented.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/11, A61K45/00, A61P25/18, 25/22, 25/24, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15, 33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/11, A61K45/00, A61P25/18, 25/22, 25/24, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15, 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, CAPplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 1382613 A1 (Sumitomo Chemical Company, Limited) 2004.01.21 & JP 2004-350672 A & CA 2432968 A	1-13
A	JP 2002-034575 A (株式会社資生堂) 2002.02.05 & WO 2002/010376 A1 & EP 1306432 A1	1-13

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.05.2005

国際調査報告の発送日

14.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 晴絵

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

3335

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 14 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲14に記載の「請求項9又は11記載の探索方法により得られる、三量体Gタンパク質 α サブユニットGm1をコードする遺伝子のプロモーターを介したシグナル伝達調節能力を有する化合物」については、化合物として具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかがまったく不明であることから、請求の範囲14は著しく不明確である。したがって、請求の範囲14に記載された発明に係る新規性、進歩性、産業上の利用可能性についての有意義な見解を示すことができない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。